

---

---

**ORIENTATION UNDER VERY LOW  
FLUENCES OF LIGHT (OWL) 1**  
**in der Niedrigstfluenzreaktion**  
**von *Arabidopsis thaliana***

---

---

Dissertation

Vorgelegt von Nicola Flosdorff

an der Fakultät für Biologie

der Ludwig-Maximilians-Universität

München, den 07.07.2016



Gutachter/in: 1. PD Dr. Cordelia Bolle

2. Prof. Dr. Herwig Stibor

Datum der Einreichung: 07.07.2016

Datum der mündlichen Prüfung: 11.10.2016

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung.....</b>	<b>8</b>
1.1 Lichtwahrnehmung durch pflanzliche Photorezeptoren .....	8
1.2 OWL1 und HFR1 in der Signaltransduktion .....	14
<b>2. Material und Methoden.....</b>	<b>16</b>
2.1 Material.....	16
2.1.1 Chemikalien .....	16
2.1.2 Medien .....	16
2.1.3 Enzyme .....	17
2.1.4 Bakterien- und Hefestämme .....	17
2.1.5 Vektoren.....	17
2.1.6 Membranen, Größenmarker, Säulenmaterial .....	18
2.1.7 Antiseren .....	18
2.2 Methoden .....	18
2.2.1 Anzucht von <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	18
2.2.1.1 Anzucht von <i>A. thaliana</i> in Sterilkultur .....	18
2.2.1.2 Verwendete <i>A. thaliana</i> Wildtyp- und Mutantenlinien.....	19
2.2.2 Molekularbiologische Methoden .....	20
2.2.2.1 Isolierung genomischer DNA aus <i>A. thaliana</i> Blattmaterial.....	20
2.2.2.2 Herstellung chemisch-kompetenter <i>Escherichia coli</i> -Zellen .....	21
2.2.2.3 Transformation von gefrierkompetenten <i>E. coli</i> -Zellen.....	21
2.2.2.4 Plasmidpräparation aus <i>E.coli</i> -Zellen .....	22
2.2.2.5 Herstellung elektrokompenter Agrobakterien <i>GV3101</i> .....	22
2.2.2.6 Transformation durch Elektroporation.....	22
2.2.2.7 Transformation von chemisch-kompetenten Agrobakterien (UIA143).....	23
2.2.2.8 DNA Behandlung mit Restriktionsendonukleasen .....	23
2.2.2.9 Standard und High-Fidelity Polymerasekettenreaktion (PCR) .....	23
2.2.2.10 Auftrennung von DNA mittels Gelelektrophorese .....	24
2.2.2.11 Klonierungsstrategie .....	24
2.2.2.12 Mutagenese des aktiven Zentrums der J-Domäne .....	25
2.2.2.13 Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation.....	26
2.2.2.14 Kompetenzinduktion von Hefezellen.....	27
2.2.2.15 Transformation von Hefezellen.....	28
2.2.2.16 Plasmidpräparation aus Hefezellen mit dem QIAprep® Spin Miniprep Kit (Qiagen).....	29
2.2.2.17 Hefe-Zwei-Hybrid-Screen.....	29
2.2.3 Biochemische Methoden.....	29
2.2.3.1 Proteinüberexpression in <i>E.coli</i> .....	29
2.2.3.2 Denaturierender Bakterienaufschluss.....	30

2.2.3.3	Dialyse zur Rückfaltung denaturierter Proteine .....	30
2.2.3.4	Pull-Down-Assay .....	31
2.2.3.5	Proteinextraktion aus Pflanzenmaterial .....	31
2.2.3.6	Proteinauftrennung über SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	32
2.2.3.7	Coomassiefärbung .....	32
2.2.3.8	Westernblot und Immunodetektion .....	32
2.2.3.9	„Crosslink“-Versuch .....	33
2.2.4	Zellbiologische Methoden .....	33
2.2.4.1	Agrobakterien-vermittelte Transformation von <i>A. thaliana</i> .....	33
2.2.4.2	Transiente Transformation von <i>Nicotiana benthamiana</i> Blättern .....	33
2.2.4.3	Protoplastenisolation aus <i>N. benthamiana</i> .....	34
2.2.4.4	Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation .....	35
2.2.4.5	Fluoreszenzmikroskopie .....	35
2.2.5	Physiologische Untersuchungsmethoden .....	35
2.2.5.1	Bestimmung der Keimungsrate nach Bestrahlung mit Dunkelrotlicht .....	36
2.2.5.2	Bestimmung der Hypokotyllänge nach Bestrahlung mit verschiedenen Lichtbedingungen .....	36
2.2.5.3	Bestimmung der agravitropischen Ausrichtung von Keimlingen unter Dunkelrotlicht .....	37
2.2.5.4	Bestimmung des Blühzeitpunktes .....	37
2.2.5.5	Statistische Untersuchungen .....	37
2.2.6	Computerprogramme .....	38
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>39</b>
3.1	Charakterisierung von OWL1 .....	39
3.1.1	Mutagenese des aktiven Zentrums der J-Domäne .....	39
3.1.2	Molekulare Charakterisierung der Mutante <i>owl1</i> .....	40
3.1.3	Phänotypische Charakterisierung der Mutante <i>owl1-1</i> und der Überexpressionslinie <i>OWL1-OE</i> .....	40
3.1.3.1	Keimungsrate unter verschiedenen Lichtbedingungen .....	41
3.1.3.2	Inhibierung der Hypokotylelongation .....	42
3.1.3.3	Zeitspanne bis zur Induktion der Blüte .....	43
3.1.3.4	Agravitropisches Wachstum unter Dunkelrotlicht .....	45
3.1.3.5	Hypokotylelongation durch die EOD FR Antwort .....	46
3.2	Subzelluläre Lokalisation von OWL1 und OWL1-QPD mittels Fluoreszenzmikroskopie .....	47
3.3	Identifikation möglicher OWL1 Interaktionsproteine .....	49
3.3.1	Bestätigung der Interaktion mittels Hefe-Zwei-Hybrid-System .....	49
3.3.2	Bestätigung der Interaktion zwischen OWL1 und HFR1 mittels „Pull-Down-Assay“ .....	51

3.3.3	Bestätigung von Interaktionen mittels „Crosslinking“ .....	52
3.3.4	Lokalisierung der Interaktion mittels bimolekularer Fluoreszenzkomplementation .....	53
3.4	Charakterisierung der Interaktionspartner .....	56
3.4.1	Phänotypische Charakterisierung der Mutanten .....	56
3.4.1.1	Keimungsrate unter verschiedenen Lichtbedingungen .....	56
3.4.1.2	Inhibierung der Hypokotylelongation .....	58
3.4.1.3	Zeitspanne bis zur Induktion der Blüte .....	60
3.4.1.4	Agravitropisches Wachstum unter Dunkelrotlicht.....	62
<b>4.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>63</b>
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>74</b>
<b>6.</b>	<b>Literatur .....</b>	<b>76</b>
<b>7.</b>	<b>Abkürzungen.....</b>	<b>84</b>
<b>8.</b>	<b>Eidesstattliche Erklärung.....</b>	<b>87</b>
<b>9.</b>	<b>Erklärung über bisherige Promotionsversuche .....</b>	<b>87</b>

## Abstract

As sessile, photoautotrophic organisms it is essential for plants to perceive the different environmental stimuli and to react accordingly. For the perception of the different light conditions for light-dependent development (photomorphogenesis) plants have evolved different families of highly sensitive photoreceptors. The phytochrome family of photoreceptors is responsible for the perception of red and far-red light. In *Arabidopsis thaliana* they are encoded by five different genes, *PHYA*, *B*, *C*, *D* and *E*. Phytochromes take part in three different signalling pathways, the low-fluence-response (LFR), the very-low-fluence response (VLFR) and the high-irradiance-response (HIR). PhyB is the main red-light receptor in LFR. PhyA is the only far-red light receptor and plays a role in VLFR and HIR. The mutant *owl1-1* shows specific defects in VLFR, but it is not impaired in HIR. The J-domain protein OWL1 has been shown to be involved in germination, cotyledon opening, hypocotyl elongation and agravitropism under VLF conditions. Since *owl1* mutant plants show a phenotype in flowering time, OWL1 seems to be important in the whole life cycle of a plant. As part of this work a role for OWL1 in VLFR as well as its interaction with the LFR-mediating phyB could be confirmed. This leads to the conclusion that there is an interplay between VLFR and LFR. Additionally, it has been confirmed, that OWL1 interacts with the bHLH-transcription factor HFR1, which is a component of the HIR signalling pathway. Experiments considering the domain structure of these proteins showed that the OWL1 C-terminus and the HFR1 N-terminus and helix-loop-helix domain are required for this interaction. Furthermore, the heat-shock-proteins HSP70-1, HSP70-3 and HSP81-2 have been identified as interaction partners of OWL1. For this interaction an intact J-domain with the essential HPD motif is essential. In a possible machinery OWL1, which belongs to the HSP40 protein family, binds a substrate, stimulates HSP70-ATPase-activity and stabilizes the complex. Additionally, an HSP90, e.g. HSP81-2, can be integrated in the complex. Transcription factors could be the substrate for this HSP machinery. It could be shown that OWL1 interacts with the phytochrome-interacting factor 1 (PIF1), which is a negative regulator for the phyB-dependent germination and which regulates germination by forming heterodimers with a positive regulator of germination, HFR1. In addition to that, an interaction with WAV2, which is involved in the molecular pathway controlling the direction of growth of the roots, could be shown. The homeobox gene *ATHB-8* is a regulator of vascular development in leaves. The expression is regulated by auxin, which is the phytohormone responsible for hypocotyl elongation and the agravitropic movement. The

protein MYB-LIKE is strongly expressed in the guard cells, which autonomously react to stimuli like blue light, temperature, CO<sub>2</sub>, drought and abscisic acid (ABA). ZINC FINGER PROTEIN 1 (ZFP1) regulates light and ABA reactions during germination and early development and functions as a transcriptional repressor involved in the inhibition of plant growth under abiotic stress conditions. Nothing is known so far about the function of the glutathione S-transferase GST TAU22. AT-HOOK MOTIF CONTAINING NUCLEAR LOCALIZED (AHL) proteins build complexes with other nuclear proteins and modulate the hypocotyl growth. Together with these proteins OWL1 is probably part of one or several functional protein complexes.

# 1. Einleitung

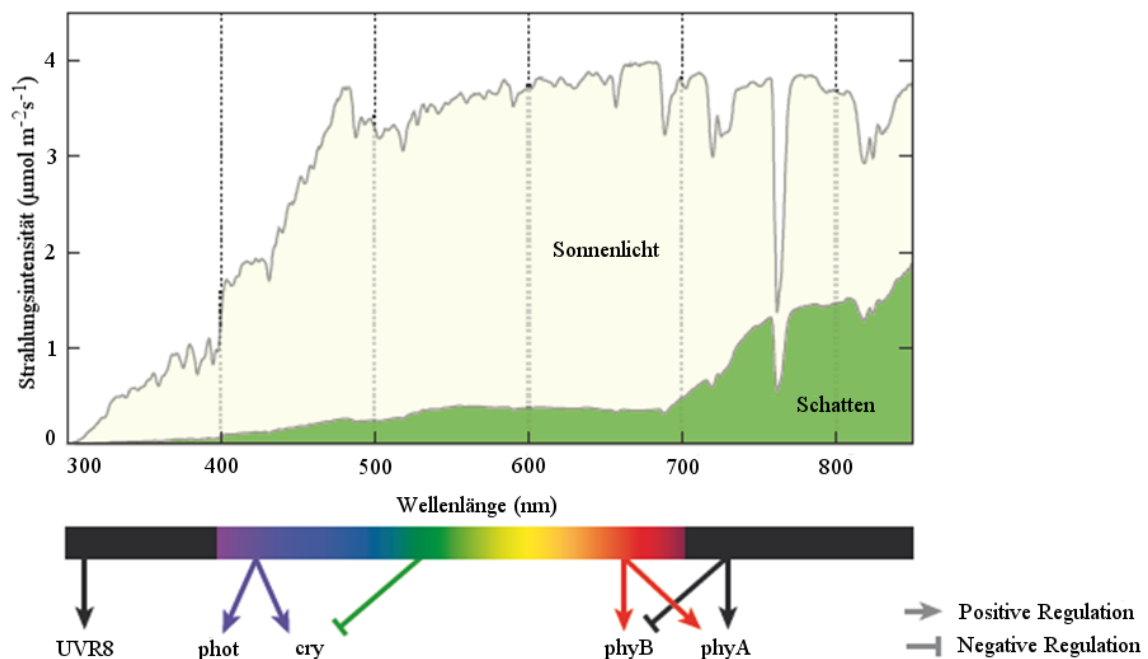
## 1.1 Lichtwahrnehmung durch pflanzliche Photorezeptoren

Pflanzen sind sessile, photoautotrophe Organismen; daher ist es für sie essentiell, die verschiedenen Umwelteinflüsse wie Temperatur, Wasser, Pathogene und Licht wahrzunehmen und entsprechend zu reagieren. Besonders die Lichtverhältnisse spielen in der pflanzlichen Entwicklung eine wichtige Rolle. Lichtqualität, -quantität und -richtung sowie die Photoperiode versorgen die Pflanzen mit wichtigen Informationen, die über Signaltransduktionsketten viele Prozesse wie beispielsweise Photosynthese oder Schutz vor den Einflüssen einer zu starken Bestrahlung einleiten und regulieren. Die lichtabhängige Entwicklung wird als Photomorphogenese bezeichnet und kann Prozesse wie Keimung, Deetiolierung des Keimlings, Gravitropismus und Phototropismus, Chloroplastenentwicklung und –bewegung, Schattenvermeidung, zirkadiane Rhythmik und Blütenbildung als Eintritt in die reproduktive Phase beeinflussen (Wu 2014).

Zur Wahrnehmung der ständig wechselnden Strahlung unterschiedlicher Wellenlänge und Intensität bei direkter Sonneneinstrahlung und im Schatten haben Pflanzen hochsensible Photorezeptoren entwickelt, die sich in verschiedene Familien aufteilen lassen (Sullivan et al. 2003). Die Phytochrome sind für die Rot- und Dunkelrotlichtperzeption (600-750 nm) und Cryptochrome für die Absorption von UV-A- und Blaulicht verantwortlich. Phototropine und die Zeitlupe-Familie sind weitere Blaulichtrezeptoren, während UV RESISTANCE LOCUS (UVR) 8 UV-B-Strahlung absorbiert (Heijde et al. 2012). Durch die verschiedenen Lichtverhältnisse werden diese Photorezeptoren aktiviert oder deaktiviert (Abbildung 1). Die Cryptochrome cry1 und cry2 regulieren Deetiolierungsprozesse, Blühinduktion und zirkadiane Rhythmik (Lin et al. 2003, Li et al. 2007). Cryptochrome besitzen zwei Chromophore, ein Flavin-Adenin-Nukleotid und ein Pterin, wodurch sie blaues Licht wahrnehmen können (Yu et al. 2007). Die Phototropine phot1 und phot2 sind für Phototropismus, Chloroplastenbewegung und Stomataöffnung zuständig (Christie 2007). In ihrer N-terminalen Region befinden sich zwei LOV-Domänen, an die je ein Flavin-Mononukleotid bindet, welches als Chromophor fungiert (Conrad et al. 2014). Die C-terminale Region beinhaltet eine Serin-/Threonin-Kinase-Domäne, welche blaulichtaktivierte Autophosphorylierung katalysiert (Cho et al. 2007). Die drei Photorezeptoren der Zeitlupe-Familie (ZTL, FKF1, LKP2) besitzen ebenfalls eine



N-terminale LOV-Domäne, verbleiben jedoch im Gegensatz zu den Phototropinen sehr lange in der Licht-aktivierten Form (Kami et al. 2010). Ihre Aufgabe besteht darin, Proteine, die an zirkadianer Rhythmik und photoperiodischer Kontrolle der Blühinduktion beteiligt sind zu degradieren oder zu stabilisieren (Christie et al. 2015). UVR8 ist ein  $\beta$ -Propeller Protein, welches als Homodimer vorliegt und bei UV-Strahlung monomerisiert. Hier fungieren Tryptophane als Chromophore (Heijde et al. 2012). Eine Vielzahl von Proteinen wird über UV-B-Licht in ihrer Expressionsrate und Enzymaktivität moduliert. Um der DNA-schädigenden Wirkung der UV-B-Strahlung entgegen zu wirken, werden zudem Polymerasen, Photolyasen und Helikasen über UV-B-Licht beeinflusst (Ahmad et al. 1997, Sakamoto et al. 2003, Liu et al. 2013).

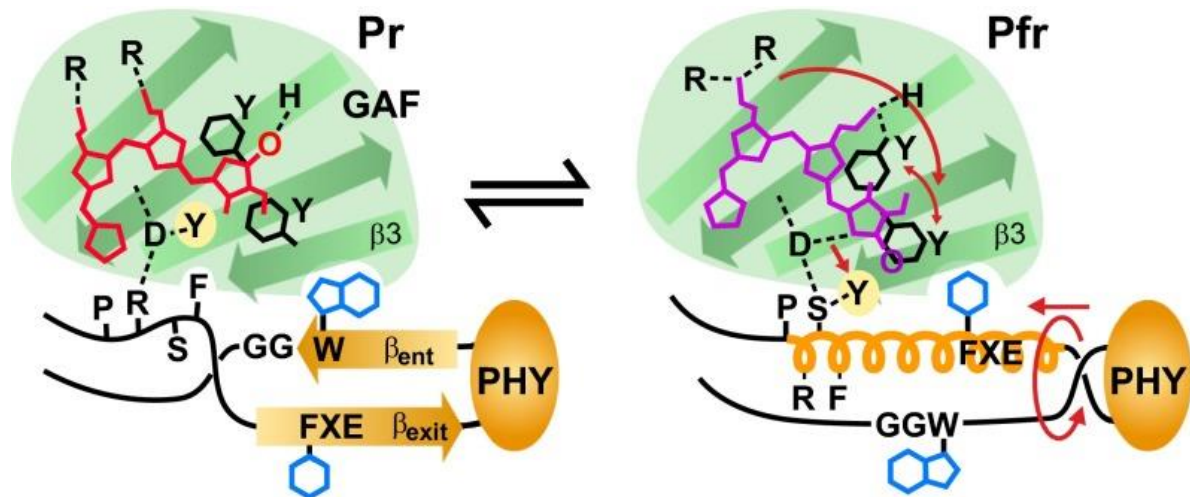


**Abbildung 1:** Spektrale Photonenverteilung von Sonnenlicht und Schatten und der Einfluss der verschiedenen Wellenlängen auf den Status von Phytochromen, Cryptochromen, Phototropinen und UVR8 [verändert nach (Casal 2013), Urheberrecht, Zustimmung nicht erforderlich].

Die Phytochrome werden in *Arabidopsis thaliana* durch fünf verschiedene Gene kodiert, *PHYA-E* (Clack et al. 1994). Die löslichen Proteine liegen als Dimere vor. Sie bestehen aus einem N-terminalen photosensorischen Bereich, bestehend aus P1, P2/PAS, P3/GAF und P4/PHY-Domäne und einer C-terminalen regulatorischen PAS und Histidin-Kinase-verwandten Domäne (HKRD) (Rockwell et al. 2006). Dadurch, dass jedes Polypeptidmonomer N-terminal kovalent an einen linearen Tetrapyrrol (Phytochromobilin) gebunden ist, können Phytochrome photoreversible Konformationsänderungen durchlaufen.

Phytochrome werden in ihrer inaktiven ( $P_R$ ) Form im Zytosol synthetisiert. Durch eine Rotlicht-induzierte reversible Z zu E Photoisomerisierung an der  $C_{15}$ - $C_{16}$  Doppelbindung des Phytochromobilins, kommt es zur Konformationsänderung des Phytochroms (Abbildung 2). Nach Licht-induzierter Rotation des D-Pyrrol-Rings, bricht das Bilin die Verbindung des D-Rings mit H403 und gleitet in die GAF-Domänen Spalte, um einen neuen Kontakt zwischen dem D-Ring und D307 und zwischen dem C-Ring und H403 zu bilden. Y276 und Y303, angrenzend an den D-Ring, rotieren entgegengesetzt der Rotationsrichtung des D-Rings. Diese Effekte initiieren eine Kollision des Y361 mit dem F585, einen Abbruch des D307/R582 Kontaktes und andere Veränderungen, die dazu führen, dass der Stamm der „Haarnadel“, bestehend aus den zwei antiparallelen  $\beta$ -Strängen  $\beta_{ent}$  und  $\beta_{exit}$ , von der GAF-Domäne gelöst wird. Der Haarnadelstamm formt eine Spirale, schwenkt um, formt einen neuen Kontakt zwischen D307 und S584 im Haarnadel-PRXSF Motiv und tauscht die  $\beta_{ent}$  für eine  $\beta_{exit}$  F588 Verbindung mit der Oberfläche der GAF-Domäne. Die Rotation und schraubenförmige Konversion des  $\beta_{exit}$  Stranges orientiert vermutlich die PHY-Domäne relativ zur GAF-Domäne um und/oder zieht am helikalen Stamm, der die PHY-Domäne mit dem Ausgangsmodul, das für die Dimerisierung zuständig ist, verbindet (Burgie et al. 2014). Liegt eine  $C_{15}$ -Z-„anti“ Konformation vor, ist das Phytochrom inaktiv in der  $P_R$ -Form. Wird Rotlicht aufgenommen, formt sich das Phytochrom in die  $C_{15}$ -E-„anti“ Konformation, die aktive  $P_{FR}$ -Form, um. In dieser Konformation interagiert es sowohl im Zytosol als auch im Nukleus mit anderen Proteinen, um die entsprechende Lichtantwort zu induzieren. Durch Dunkelrotlicht kann die aktive  $P_{FR}$ -Form wieder in die inaktive  $P_R$ -Form umgewandelt werden (Bae et al. 2008). Die strukturellen Veränderungen durch die Photoisomerisierung wirken sich auf die biochemische Aktivität des gesamten Proteins aus. Bei Rotlicht liegt Phytochrom in der aktiven ( $P_{FR}$ ) Form mit einem Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 730 nm und bei Dunkelrotlicht in der inaktiven ( $P_R$ ) Form mit einem Absorptionsmaximum von 666 nm vor. Der beschriebene lichtwellenabhängige Wechsel zwischen  $P_R$ - und  $P_{FR}$ -Form wird als Photoreversibilität bezeichnet (Rockwell et al. 2006). Eine Ausnahme stellt phyA dar, da es von Dunkelrotlicht aktiviert wird. Da sich die Absorptionsspektren der beiden Formen allerdings leicht überschneiden, existiert stets ein dynamisches Equilibrium. Als Folge der Konformationsänderung kann die aktive  $P_{FR}$ -Form des Phytochroms in den Nukleus transportiert werden, wo sich die Phytochrome zu lokalen Proteinhäufungen („Speckles“) zusammenschließen (Nagy et al. 2001, Kim et al. 2002). Dort leiten sie die Aktivierung oder Degradierung verschiedener Transkriptionsfaktoren ein (Monte et al. 2007, Leivar et al. 2011). Phytochrome können anhand ihrer Lichtstabilität in

zwei Gruppen aufgeteilt werden. PhyB-E sind lichtstabil und werden nicht abgebaut. Sie sind während der gesamten Entwicklungsphase der Pflanze vorhanden. PhyA ist lichtinstabil, es wird in der Dunkelheit gebildet und akkumuliert in der P<sub>R</sub>-Form in großen Mengen. Die Aktivierung durch Dunkelrotlicht verursacht die Degradierung von phyA, welches Keimungs- und Deetioliierungsprozesse in Gang gesetzt hat.



**Abbildung 2:** Modell für die Photoreversibilität von Phytochrom [(Burgie et al. 2014) Urheberrecht, Zustimmung nicht erforderlich].

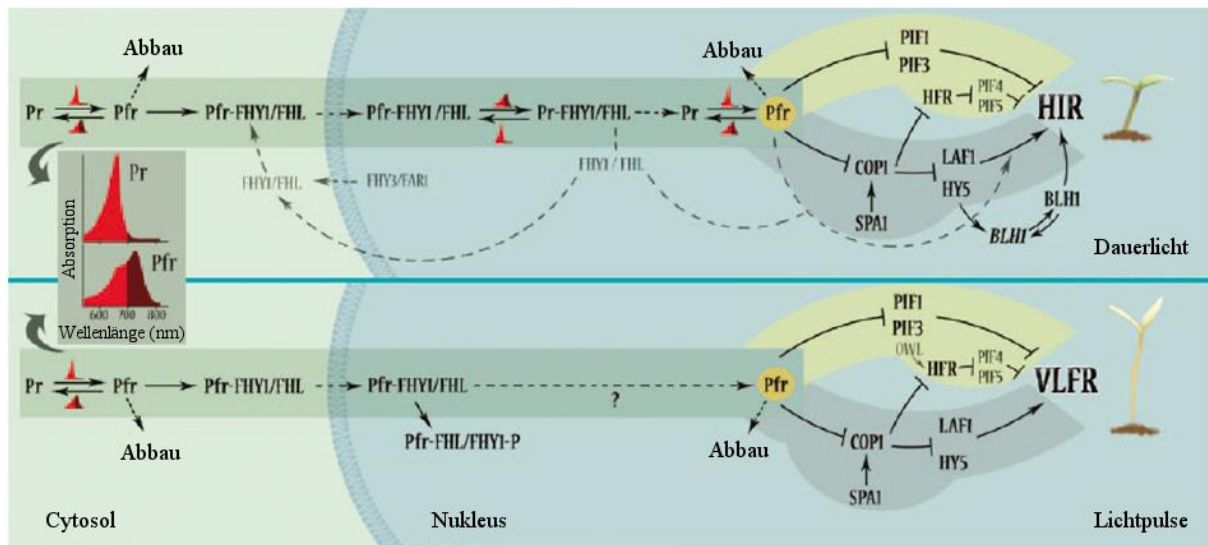
Da die P<sub>FR</sub>-Form von phyA im Gegensatz zu der aller anderen Phytochrome auch während Belichtung mit Dunkelrotlicht gebildet und stabilisiert werden kann, stellt phyA den einzigen Dunkelrotlichtrezeptor in *A. thaliana* dar. Es gibt drei Signalwege, an denen Phytochrome beteiligt sind: die Niedrig-Fluenz-Antwort (low-fluence-response, LFR), die Niedrigst-Fluenz-Antwort (very-low-fluence-response, VLFR) und die Hochintensitäts-Reaktion (high-irradiance-response, HIR). PhyB übernimmt die Rolle des Hauptrotlichtrezeptors. Der entsprechende Signalweg, die LFR, wird durch Rotlicht ab einer Lichtquantität von  $1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  ausgelöst (Casal et al. 1998). Dadurch werden Keimung und auch die Induktion der Blütenbildung gesteuert. Außerdem kann bei zu starker Beschattung, die durch einen zu großen Anteil an dunkelrotem Licht erkannt wird, eine „Schattenvermeidungsreaktion“ ausgelöst werden. Diese beinhaltet verstärktes Hypokotylwachstum, verstärktes Längenwachstum der Blätter und eine frühere Induktion der Blütenbildung. Die Schattenvermeidungsreaktion wird durch phyB, D und E gesteuert (Wang et al. 2002). Die VLFR wird von phyA vermittelt und durch extrem niedrige Intensitäten (weniger als  $0,01 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) von Licht verschiedener Wellenlängen zwischen 300-780 nm aktiviert. Dadurch werden Keimung und Deetioliierung gesteuert

(Bae et al. 2008). Die Dunkelrotlicht-HIR wird durch höhere Dosen an kontinuierlichem Dunkelrotlicht induziert. PhyA spielt in den beiden Signalwegen, VLFR und HIR, eine Rolle. Sie übernehmen eine wichtige Funktion bei der Keimung, Deetiolierung, der Inhibition des Hypokotylwachstums oder der Anthocyansynthese (Sullivan et al. 2003, Kneissl et al. 2008). Die VLFR initiiert die Deetiolierung des aus der Erde wachsenden Keimlings, die HIR vervollständigt die Deetiolierung unter dichten Baumkronen und benötigt eine nachhaltigere Aktivierung durch Dunkelrotlicht (Casal et al. 2013). Phytochrome initiieren lichtabhängige Signalketten, die aus zahlreichen Intermediaten bestehen. Diese sind miteinander vernetzt und beeinflussen sich gegenseitig, was zu den verschiedenen physiologischen Reaktionen führt.

Phytochrome regulieren ihre Lichtantworten mittels Proteininteraktionen. Diese werden auch benötigt um die Phytochrom-Dimere aktiv in den Kern zu transportieren. Da phyA keine Kernlokalisierungssequenz besitzt, bindet es zum Kernimport an die Proteine FAR-RED ELONGATED HYPOCOTYL (FHY) 1 und sein Homolog FHY1-like (FHL) (Genoud et al. 2008). Das Kernlokalisierungs-Signal und die PhyA-Interaktionsdomäne von FHY1 sind dafür von Bedeutung. Auch phyB interagiert im Zytosol zum Kernimport mit Transport-Helferproteinen, die eine Kernlokalisierungssequenz besitzen, wie PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR (PIF) 1, 3, 4 und 5 (Pfeiffer et al. 2012). Die Mechanismen und Faktoren, die für die Translokation von phyC, D und E vom Zytosol in den Kern zuständig sind, sind noch unklar (Ádám et al. 2013). Im Kern werden die Phytochrome durch weitere Proteininteraktionen reguliert - und somit die pflanzliche Entwicklung und der physiologische Zustand (Abbildung 3).

Im Zellkern gibt es zwei sich gegenüberstehende Gruppen von Transkriptionsfaktoren, negative Regulatoren wie die PHYTOCHROME-INTERACTING FACTORS (PIFs) und positive Regulatoren wie LONG HYPOCOTYL IN FAR RED (HFR) 1, ELONGATED HYPOCOTYL (HY) 5, LONG AFTER FAR-RED LIGHT (LAF) 1 und BELL-LIKE HOMEODOMAIN (BLH) 1. PIFs sind „basic-Helix-Loop-Helix“-Proteine (bHLH). PIF3 fungiert im Dunkeln als Suppressor der Photomorphogenese, im Licht wird es phosphoryliert und abgebaut (Ni et al. 2013). PIF3 kann außerdem an die Promotoren verschiedener lichtgesteuerter Gene binden. So kann durch eine Bindung an phyA oder phyB die Aktivität dieses Transkriptionsfaktors unterbunden und somit die Photomorphogenese initiiert werden (Monte et al. 2007, Leivar et al. 2008). Für den bHLH-Faktor HFR1 sowie für zwei weitere Transkriptionsfaktoren, den Myb-Faktor LAF1 und den „basic leucine zipper factor“ HY5 konnte im Dunkeln ein proteolytischer Abbau über das Ubiquitin-Proteasom-System gezeigt

werden (Saijo et al. 2003, Seo et al. 2003, Jang et al. 2005). Dadurch kann die Photomorphogenese, die im Dunkelrotlicht über diese Transkriptionsfaktoren vermittelt wird, unterdrückt werden. Eine wichtige Rolle spielt dabei CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC (COP) 1, der Master-Repressor der Photomorphogenese, welcher über eine E3 Ubiquitin Ligase-Aktivität verfügt und somit die Degradation von Proteinen einleitet. COP1 kann im Dunkeln im Kern mit den Transkriptionsfaktoren interagieren; unter Lichteinfluss wird es mithilfe von FAR-RED INSENSITIVE (FIN) 219 aus dem Kern transportiert (Hsieh et al. 2000). Dieser Transport ist jedoch zeitlich so verzögert, dass COP1 noch die Degradation von phyA<sub>FR</sub> vermitteln kann, welches lichtabhängig in den Kern transportiert und abgebaut wird. Die aktive P<sub>FR</sub>-Form der Phytochrome kann COP1 und auch PIFs inhibieren, wodurch positive Transkriptionsfaktoren Lichtantworten induzieren können (Osterlund et al. 1998, Bauer et al. 2004). Ein weiteres Protein, welches die Aktivität von COP1 beeinflusst, ist SUPPRESSOR OF PHYA (SPA) 1. Es ist ein Suppressor der phyA-vermittelten Deetiolierung und beeinflusst die Ubiquitinierungseffizienz von COP1 (Hoecker et al. 2001). Die Mehrzahl der hier beschriebenen Proteine ist an der HIR beteiligt und wurde über „screens“ von Mutanten unter starkem Dunkelrotlicht isoliert. Über den phyA-abhängigen VLFR-Signalweg und den molekularen Mechanismus, der die Unterscheidung zwischen VLFR bei Lichtpulsen und HIR bei Dauerlicht kontrolliert, ist bisher nur wenig bekannt. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Phosphorylierung des Photorezeptors bei dieser Unterscheidung eine Rolle spielt. 2009 wurde die erste spezifische VLFR-Mutante, *owl1*, kloniert und anschließend charakterisiert (Kneissl et al. 2009).



**Abbildung 3:** Signaltransduktion von phyA unter VLFR und HIR Bedingungen. Es werden drei Hauptmodule präsentiert: PhyA Signalwahrnehmung, COP1 Signaltransduktion und PIF Signaltransduktion [verändert nach (Casal et al. 2013) Urheberrecht, Zustimmung nicht erforderlich].

## 1.2 OWL1 und HFR1 in der Signaltransduktion

*ORIENTATION UNDER VERY LOW FLUENCES OF LIGHT (OWL) 1* ist ein Gen mit 11 Exons und kodiert für ein J-Domänen Protein bestehend aus 538 Aminosäuren. Die Sequenz wurde in allen bisher analysierten höheren Pflanzen nachgewiesen. Da es weder eine Zinkfingerdomäne noch „Cysteinerepeats“ am C-terminalen Ende aufweist, wird es der Klasse III der J-Domänen Proteine zugeordnet. Die stark konservierte J-Domäne besteht aus vier  $\alpha$ -Helices mit einem HPD Motiv nach der zweiten Helix. OWL1 ist ein Positivregulator für den VLFR-Signalweg und wird in allen Geweben exprimiert. Es wurde eine Rolle bei Keimung, Kotyledonenöffnung, Hypokotylelongation, Agravitropismus und Blühzeit nachgewiesen. Bei Dunkelheit ist es sowohl im Zytoplasma als auch im Kern gleichermaßen vorhanden, wohingegen Lichtzufuhr eine Relokalisierung des Proteins in den Zellkern bewirkt. OWL1 agiert in der Signalkette nachfolgend von phyA.

HFR1 ist ein positiver Regulator der phyA-vermittelten HIR. Es handelt sich um einen atypischen bHLH-Transkriptionsfaktor, der keine DNA-Bindedomäne besitzt. HFR1 ist zusätzlich in die von cry1 vermittelte Blaulichtsignaltransduktion involviert (Duek et al. 2003). Es agiert in der Signalkette nachfolgend von phyA und cry1 und ist im Nukleus lokalisiert. Es spielt eine Rolle bei der Deetiolierung von Keimlingen. HFR1 wird im Dunkeln durch die Ubiquitin E3 Ligase COP1 ubiquitinyliert und darauffolgend im

Proteasom degradiert. Durch die Degradation wird der Einfluss von HFR1 auf die Photomorphogenese inhibiert (Duek et al. 2004). HFR1 kann direkt mit COP1 interagieren (Jang et al. 2005). Zudem konnte eine Interaktion mit dem Myb-Faktor LONG AFTER FAR-RED LIGHT (LAF) 1 nachgewiesen werden. Die beiden Proteine stabilisieren sich gegenseitig, wodurch die Ubiquitinierung durch COP1 verhindert und die phyA Photoantwort verstärkt wird (Jang et al. 2007). Zusätzlich wurde eine Komplexbildung mit PIF1 nachgewiesen (Shi et al. 2013). Die Bindung von HFR1 an PIF1 initiiert die durch phyB vermittelte lichtinduzierte Keimung. HFR1 kann nicht direkt an Phytochrome binden; es wurde jedoch nachgewiesen, dass HFR1 an PIF3 binden kann. Dieser Komplex wiederum bindet die P<sub>FR</sub>-Form von phyA und phyB (Fairchild et al. 2000). Außerdem konnte gezeigt werden, dass HFR1 mit OWL1 interagiert (Kneissl et al. 2009).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Interaktion der beiden Proteine OWL1 und HFR1 unter Berücksichtigung der Domänenstruktur genauer charakterisiert. Außerdem wurde untersucht, welche Proteine zusätzlich an einer Komplexbildung beteiligt sein oder eine Rolle in den betreffenden Signalwegen spielen könnten.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien

Alle Standardchemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, von den Firmen Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland), Merck (München, Deutschland) und Roth (Karlsruhe, Deutschland) bezogen.

#### 2.1.2 Medien

Folgende Medien wurden verwendet: LB-Medium (1% Pepton, 1% NaCl, 0,5% Hefeextrakt) zur Bakterienanzucht, YPAD-Medium (2% Pepton, 2% Glukose, 1% Hefeextrakt, 0,01% Adenin-Hemisulfat) zur Hefeanzucht, SC-Medium (1,34% Yeast Nitrogen Base, 0,28% Yeast Synthetic Drop-out Medium Supplement, 2% Glukose) zur Hefeselektion und ½ MS-Medium (Duchefa, Menge gemäß Protokoll des Herstellers) mit oder ohne 1% Saccharose zur Anzucht von Pflanzenmaterial. Zur Bakterienselektion verwendete Antibiotika und ihre Endkonzentrationen sind Tabelle 1 zu entnehmen.

**Tabelle 1:** Übersicht über die zur Bakterienselektion verwendeten Antibiotika und ihre Endkonzentrationen

Antibiotikum/ Abkürzung	Endkonzentration im Medium
Ampicillin/ Amp	100µg/ml
Kanamycin/ Kana	50µg/ml
Gentamycin/ Genta	25µg/ml
Streptomycin/ Strep	50µg/ml
Spectinomycin/ Spec	50µg/ml
Rifampicin/ Rif	25µg/ml



### 2.1.3 Enzyme

Für die Klonierungen verwendete Restriktionsenzyme und DNA-Polymerasen wurden von den Firmen Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) und New England Biolabs (Boston, USA) bezogen.

### 2.1.4 Bakterien- und Hefestämme

Zur Vervielfältigung von DNA wurden der *E.coli* Stamm TOP10 von Invitrogen (Darmstadt, Deutschland), DB3.1 oder Stellar Zellen verwendet. Rekombinante Proteine wurden in *E.coli* Zellen des Stammes BL21-CodonPlus(DE3)-Ripl von Stratagene überexprimiert. *N. benthamiana* wurde mit Agrobakterien des Stammes GV3101 transient transformiert. Für die stabile Transformation von *A. thaliana* wurden Agrobakterien des Stammes UIA143 verwendet. Der Yeast-Two-Hybrid Screen wurde mit dem Hefestamm MaV203 durchgeführt.

### 2.1.5 Vektoren

In Tabelle 2 sind verwendete Vektoren und ihre Bezugsquellen angegeben.

**Tabelle 2:** Liste der verwendeten Vektoren und ihrer Bezugsquellen

Name des Vektors	Firma/ Herkunft
pENTR/SD/D-TOPO	Invitrogen
pGEM-T Easy	Promega
pk7WGF2, pb7FWG2	Karimi et al. 2002
HISpEXP, GSTpGEX (pGEX-4T-1)	GE Healthcare, Kneissl et al. 2009
pDest17, pDest22, pDest32	Invitrogen
pDBLeu, pExAD	Invitrogen
pBiFC3, pBiFC4	Zilian et al. 2011

### 2.1.6 Membranen, Größenmarker, Säulenmaterial

PVDF-Membranen (Polyvinylfluorid; Hybond-PVDF) wurden von der Firma GE Healthcare (München, Deutschland) und Blotpapier von Macherey-Nagel (Düren, Deutschland) bezogen. Für die Größenbestimmung der Proteine in der SDS-PAGE wurde der Page Ruler Plus prestained Protein ladder von New England Biolabs verwendet. Um die Größe von DNA-Fragmenten in Agarosegelen zu bestimmen wurde der 1 Kb Plus DNA Ladder von Invitrogen verwendet. HIS-getagte Proteine wurden mit Ni-NTA Agarose von Qiagen aufgereinigt. Für GFP-getagte Proteine wurde GFP-Trap A von Chromotek (Martinsried, Deutschland) verwendet.

### 2.1.7 Antiseren

Verwendete Antikörper und ihre jeweiligen Verdünnungen sind Tabelle 3 zu entnehmen.

**Tabelle 3:** Übersicht über die verwendeten Antikörper, die dazugehörigen sekundären Antikörper und die jeweiligen Verdünnungen

1.Antikörper	Verdünnung	Herkunft	2.Antikörper	Verdünnung	Herkunft
Anti-HIS	1:2000	Qiagen	Anti-Maus	1:25000	Invitrogen
Anti-GST	1:10000	Sigma	Anti-Maus	1:25000	Invitrogen
Anti-GFP	1:5000	Invitrogen	Anti-Kaninchen	1:25000	Sigma
Anti-OWL1	1:2000	C. Bolle V. Wachtler	Anti-Maus	1:25000	Invitrogen

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Anzucht von *Arabidopsis thaliana*

#### 2.2.1.1 Anzucht von *A. thaliana* in Sterilkultur

Die benötigte Menge an *Arabidopsis* Samen wurde für zehn Minuten in einem Milliliter Sterilisationslösung (50% DanKlorix Hygienereiniger von Colgate-Palmolive GmbH, 50% ddH<sub>2</sub>O) geschüttelt. Die Samen wurden bei 1000 g abzentrifugiert, der Überstand

verworfen und die Samen dreimal mit jeweils einem Milliliter sterilem Wasser gewaschen. Anschließend wurden die Samen auf Petrischalen mit ½ MS-Festmedium ausgelegt.

#### 2.2.1.2 Verwendete *A. thaliana* Wildtyp- und Mutantenlinien

Eine Übersicht über verwendete *A. thaliana* Wildtyp- und Mutantenlinien und ihre Bezugsquellen ist in Tabelle 4 dargestellt.

**Tabelle 4:** Übersicht über die verwendeten *A. thaliana* Wildtyp- und Mutantenlinien und ihre Bezugsquellen.

Linie	Bezugsquelle/ Literaturangabe
Ökotyp Columbia Col-0	NASC
<i>owl1-1</i> (AT2G35720)	Kneissl et al. 2009
<i>phyA-211</i>	NASC
<i>phyB-1</i>	NASC
<i>phyA</i> x <i>phyB</i>	C. Bolle
<i>owl1</i> x <i>phyA</i>	Julia Kneißl
<i>owl1</i> x <i>phyB</i>	Julia Kneißl
<i>hfr1</i> (AT1G02340)	Jang et al. 2005
<i>owl1</i> x <i>hfr1</i>	Julia Kneißl
<i>OWL1-OE</i>	Volker Wachtler
<i>HFR1-OE</i>	Jang et al. 2005
<i>OWL1-OE</i> x <i>HFR1-OE</i>	Julia Kneißl
<i>OWL1-OE</i> x <i>hfr1</i>	Julia Kneißl
<i>HFR1-OE</i> x <i>owl1</i>	Julia Kneißl
<i>OWL1-OE-GFP</i>	Nicola Flosdorff, diese Arbeit
<i>OWL1-QPD-GFP</i>	Nicola Flosdorff, diese Arbeit
<i>OWL1/owl1</i> (Komplementation)	Nicola Flosdorff, diese Arbeit
<i>OWL1QPD/owl1</i> (Komplementation)	Nicola Flosdorff, diese Arbeit
<i>hsp81-2</i> (AT5G56030) SALK_042922	NASC
<i>wav2</i> (AT5G20520) SALK_087022	NASC
<i>hsp70-1</i> (AT5G02500) SALK_135531C	NASC
<i>hsp70-3</i> (AT3G09440) SALK_013280C	NASC
<i>myb-like</i> (AT2G38300) SALK_103038C	NASC
<i>at hook</i> (AT3G04590) SALK_081411C	NASC
<i>homeobox8</i> (AT4G32880) SALK_065586	NASC
<i>pif1</i> (AT2G20180) SALK_131872C	NASC
<i>zinc finger 1</i> (AT1G80730) SALK_015578C	NASC
<i>gst tau 22</i> (AT1G78340) SALK_073524	NASC

## 2.2.2 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.2.1 Isolierung genomischer DNA aus *A. thaliana* Blattmaterial

Für die Genotypisierung (verwendete Primer siehe Tabelle 5) wurde genomische DNA aus *A. thaliana* isoliert. Dazu wurde jeweils ein Blatt mit 400 µl Extraktionspuffer (200 mM Tris/HCl pH 7,5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0,5% SDS (v/v)) versetzt. Anschließend wurde das Blatt in der Kugelmühle TissueLyser II (Qiagen, hergestellt von Retsch) zerkleinert und dann für 10 min bei 14000 g zentrifugiert. 300 µl des Überstandes wurden mit 300 µl Isopropanol gut gemischt und für weitere 10 min bei 14000 g zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 1 ml 70%igem Ethanol gewaschen und der Ansatz wurde erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet für 30 min an der Luft getrocknet und in 100 µl ddH<sub>2</sub>O resuspendiert. Anschließend wurde eine Polymerasekettenreaktion (PCR), wie in Kapitel 2.2.2.9 beschrieben, durchgeführt.

**Tabelle 5:** Für den Insertionsnachweis verwendete Primer. fw: Vorwärtsprimer, rev: Rückwärtsprimer

Gen	Sequenz 5`-3`fw Sequenz 5`-3`rev
<i>OWL1</i>	5`-GTA ACT CAA CAG CAT CAA TCA CGG-3` 5`-GTT GTC TGC ACT CCA ATA AGC G-3`
<i>HFR1</i>	5`-ATG TCA ACA GTG GGG GTG AAT CC-3` 5`-GCT CGG TGT ATG GTT GAT GAT GAC-3`
<i>OWL1-OE</i>	5`-CGT AAG GGA TGA CGC ACA ATC C-3` 5`-TGC ACT CCA ATA AGC GAC TG-3`
<i>HFR1-OE</i>	5`-CGT AAG GGA TGA CGC ACA ATC C-3` 5`-TCA CAT CAT CTG AAG TTG AAG TTG-3`
<i>HSP81-2</i>	5`-CAC CAT GGC GGA CGC TGA AAC CTT TGC-3` 5`-TCA GTC GAC TTC CTC CAT CTT GC-3`
<i>WAV2</i>	5`-CAC CAT GGT GAC GTA CGT GAG CGC GTT G-3` 5`-TCA CCT TCC TGT ATC TTC TTT CC-3`
<i>HSP70-1</i>	5'-CAC CAT GTC GGG TAA AGG AGA AG-3' 5'-TTA GTC GAC CTC CTC GAT C-3'
<i>HSP70-3</i>	5'-CAC CAT GGC TGG TAA AGG AGA AG-3' 5'-TTA GTC GAC TTC CTC AAT CTT G-3'

<i>MYB-LIKE</i>	5'-TCA GCT ACC GAT GTT CCG AG-3' 5'-GCT CTT TTT CCA CGA AGA CG-3'
<i>ATHOOK</i>	5'-CAC CAT GGA TCC TAA CGA AAG CC-3' 5'-CTA ATC CGG TAT TTG CTG C-3'
<i>HOMEBOX 8</i>	5'-CAC CAT GGG AGG AGG AAG CAA TAA-3' 5'-TCA TAT AAA AGA CCA GTT GAG GAA C-3'
<i>PIF1</i>	5'-CTC TTT TGG ATC TTT CTG GGG-3' 5'-GAC TTG CGC ACG ATA GCT AAC-3'
<i>ZINC FINGER 1</i>	5'-CAC CAT GGA ACC GTC CAT CAA AG-3' 5'-TCA TAG CTT AAG AGT CAA GTC AAT T-3'
<i>GST TAU 22</i>	5'-CAC CAT GGC GGA TGA AGT GAT AC-3' 5'-TTA GAC ACA GTA TAT CTT CCT AAT C-3'

#### 2.2.2.2 Herstellung chemisch-kompetenter *Escherichia coli*-Zellen

Bakterien wurden auf einer LB-Platte ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C kultiviert. Eine Kolonie wurde anschließend in 100 ml LB-Flüssigmedium überführt und bei 37 °C unter konstantem Schütteln (200 UpM) bis zu einer OD<sub>600</sub>=0,3 angezogen. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (5 min, 5000 g, 4°C) sedimentiert und der Überstand verworfen. Die Bakterien wurden in 10 ml eisgekühltem, sterilem Tfb1-Puffer (100 mM KCl, 50 mM MnCl<sub>2</sub>, 30 mM KAc, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 15% Glycerin (v/v)) resuspendiert und 5 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden erneut sedimentiert, der Überstand verworfen und das Sediment in 4 ml sterilem Tfb2-Puffer (75 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM Na-MOPS, 10 mM KCl, 15% Glycerin (v/v), pH7,0) aufgenommen. Aliquots zu je 200 µl wurden in flüssigem N<sub>2</sub> schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

#### 2.2.2.3 Transformation von gefrierkompetenten *E. coli*-Zellen

50 µl auf Eis aufgetaute chemisch-kompetente Zellen wurden mit der jeweiligen Menge an Plasmid-DNA versetzt. Nach 20-minütiger Inkubation auf Eis wurde der Ansatz für 45 s im Thermoschüttler auf 42 °C erhitzt und anschließend sofort auf Eis abgekühlt. Es wurden 200 µl LB-Flüssigmedium zugegeben und für eine Stunde bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen auf Petrischalen mit LB-Festmedium, versetzt mit dem jeweiligen erforderlichen Antibiotikum, ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

#### 2.2.2.4 Plasmidpräparation aus *E.coli*-Zellen

Die Plasmidpräparation erfolgte unter Verwendung des Miniprep-Kits von Qiagen gemäß dem Herstellerprotokoll.

#### 2.2.2.5 Herstellung elektrokompenter Agrobakterien *GV3101*

Es wurde eine Vorkultur in 3 ml LB-Flüssigmedium (Gent/Rif, jeweils 25mg/ml) angeimpft und über Nacht bei 28 °C und 160 UpM geschüttelt. Am nächsten Tag wurden 200 ml LB-Selektionsmedium mit dieser Vorkultur angeimpft und ÜN bei 28 °C geschüttelt. Die Kultur wurde anschließend abzentrifugiert (6000 g, 15 min, 4 °C). Das Pellet wurde in 100 ml eiskaltem 1 mM HEPES, pH 7 resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 50 ml 10% Glycerin in LB-Medium gewaschen und abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 20 ml 10% Glycerin in LB aufgenommen, aliquotiert, die Proben in flüssigem N<sub>2</sub> eingefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

#### 2.2.2.6 Transformation durch Elektroporation

2 µl DNA (verwendete Konstrukte sind Tabelle 6 zu entnehmen) wurden mit 50 µl auf Eis aufgetauten Zellen gemischt und in eine Elektroporationsküvette gegeben. Die Elektroporation erfolgte bei 2,5 kV. Es wurden sofort 500 µl LB-Flüssigmedium zugegeben und der Ansatz 2 h bei 28 °C geschüttelt. Die Zellen wurden in Petrischalen mit LB-Selektionsmedium ausplattiert und für 2-4 Tage bei 28 °C inkubiert.

**Tabelle 6:** Liste der für die Transformation von Agrobakterien verwendeten Konstrukte

Konstrukt	Agrobakterienstamm
<i>OWL1/ pk7FWG2</i>	UIA143
<i>OWL1/ pb7WGF2</i>	UIA143
<i>OWL1 QPD/ pk7FWG2</i>	UIA143
<i>OWL1 QPD/ pb7WGF2</i>	UIA143
<i>OWL1/ pBiFC4</i>	GV3101
<i>HFR1/ pBiFC3</i>	GV3101

<i>HSP70-1/</i> pBiFC3	GV3101
<i>HSP70-3/</i> pBiFC3	GV3101
<i>HSP81/</i> pBiFC3	GV3101
<i>WAV2/</i> pBiFC3	GV3101
<i>HOMEBOX8/</i> pBiFC3	GV3101
<i>PIF1/</i> pBiFC3	GV3101
<i>MYB-LIKE/</i> pBiFC3	GV3101
<i>GST TAU 22/</i> pBiFC3	GV3101

#### 2.2.2.7 Transformation von chemisch-kompetenten Agrobakterien (UIA143)

2 µl DNA wurden mit 50 µl auf Eis aufgetauten Zellen gemischt und für 15 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock für 5 min bei 37 °C wurden 200 µl LB-Medium zugegeben und der Ansatz für 30 min bei 28 °C geschüttelt. Anschließend wurden die Zellen auf Selektionsmedium ausplattiert und für 2-4 Tage bei 28 °C inkubiert.

#### 2.2.2.8 DNA Behandlung mit Restriktionsendonukleasen

Der Restriktionsansatz, bestehend aus 2 µl Plasmidpräparation, 1 µl 10x Superdo-Puffer (625 mM Kac, 330 mM Tris/HCl pH 7,8, 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 40 mM Spermidin, 5 mM DTT), 0,3 µl Restriktionsendonuklease und 6,7 µl ddH<sub>2</sub>O wurde für 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde, falls laut Herstellerangabe erforderlich, durch 10-minütige Inkubation bei 65 °C die Restriktionsendonuklease inaktiviert.

#### 2.2.2.9 Standard und High-Fidelity Polymerasekettenreaktion (PCR)

Um DNA-Sequenzen zu amplifizieren, wurde die Polymerase-Kettenreaktion angewandt (Green et al. 2012). Diese wurde nach Angabe der Enzymhersteller durchgeführt. Verwendet wurde Taq-Polymerase von Qiagen oder Phusion High-Fidelity DNA Polymerase von Finnzymes. Als Template wurde cDNA von *A. thaliana*, die vom Labor bereitgestellt wurde oder genomische DNA verwendet. Das PCR-Produkt wurde anschließend auf ein 1%iges

Agarosegel aufgetragen, die relevante Bande ausgeschnitten und mit dem Qiagen Gelextraktionskit nach Herstellerangaben aufgereinigt.

#### 2.2.2.10 Auftrennung von DNA mittels Gelelektrophorese

Es wurden horizontale Gelapparaturen verwendet. Als Laufpuffer wurde 1x TAE-Puffer (150 mM TrisHCl, 1,74 M Essigsäure, 1 mM EDTA) eingesetzt. Die mit 1/10 Volumen Auftragspuffer (50 mM TrisHCl pH 7,6, 50 mM EDTA, 0,025 % Bromphenol Blau (w/v), 60% Glycerin) versetzte DNA-Probe wurde auf das Agarosegel (1% Agarose (w/v)) aufgeschmolzen in 1x TAE, 0,01% Ethidiumbromid (v/v)) aufgetragen und bei 100 V für 30 min aufgetrennt. Die Geldokumentation erfolgte über ein „BioDocAnalyse-Gerät“ (Biometra).

#### 2.2.2.11 Klonierungsstrategie

Um Eingangsklone für das Gatewaysystem zu erzeugen, wurden PCR-Produkte (verwendete Primer sind Tabelle 7 zu entnehmen) gemäß den Herstellerangaben in den Vektor pENTR™/SD/D-TOPO® (Invitrogen) kloniert. Unter Verwendung der LR Clonase-Reaktion war es möglich, DNA-Fragmente aus pENTR/SD/D-TOPO in Destinationsvektoren umzuklonieren. Diese Reaktion erfolgte gemäß Herstellerprotokoll mithilfe des „Gateway® LR Clonase® II enzyme mix“ (Invitrogen). Die jeweilige Ansätze wurden in *E.coli* Zellen transformiert und die entstandenen Klone mittels Sequenzierung durch den Sequencing Service der Fakultät für Biologie (LMU München, [http://www.gi.bio.lmu.de/sequencing/index\\_html](http://www.gi.bio.lmu.de/sequencing/index_html)) auf ihre Richtigkeit überprüft.

**Tabelle 7:** Liste der für die Klonierungen verwendeten Primer. Fw: Vorwärtsprimer, rev: Rückwärtsprimer

Oligoname	Sequenz 5`-3`
MYB-LIKE TOPO fw	5'-CAC CAT GAT TCC AAG TAT GGA GGG-3'
MYB-LIKE TOPO rev	5'-TCA TAG AGT CAG ATC CAG AGT ACT C-3'
ZINC FINGER 1 TOPO fw	5'-CAC CAT GGA ACC GTC CAT CAA AG-3'
ZINC FINGER 1 TOPO rev	5'-TCA TAG CTT AAG AGT CAA GTC AAT T-3'
PIF1 TOPO fw	5'-CAC CAT GCA TCA TTT TGT CCC TG-3'



PIF1 TOPO rev	5'-TTA ACC TGT TGT GTG GTT TCC-3'
GST TAU 22 TOPO fw	5'-CAC CAT GGC GGA TGA AGT GAT AC-3'
GST TAU 22 TOPO rev	5'-TTA GAC ACA GTA TAT CTT CCT AAT C-3'
ATHOOK TOPO fw	5'-CAC CAT GGA TCC TAA CGA AAG CC-3'
ATHOOK rev TGA	5'-CTA ATC CGG TAT TTG CTG C-3'
HOMEBOX 8 TOPO fw	5'-CAC CAT GGG AGG AGG AAG CAA TAA-3'
HOMEBOX 8 rev TGA	5'-TCA TAT AAA AGA CCA GTT GAG GAA C-3'
HSP70-1 TOPO fw	5'-CAC CAT GTC GGG TAA AGG AGA AG-3'
HSP70-1 rev TGA	5'-TTA GTC GAC CTC CTC GAT C-3'
HSP70-3 TOPO fw	5'-CAC CAT GGC TGG TAA AGG AGA AG-3'
HSP70-3 rev TGA	5'-TTA GTC GAC TTC CTC AAT CTT G-3'

#### 2.2.2.12 Mutagenese des aktiven Zentrums der J-Domäne

Für die Mutagenese des Konstruktes pENTR/D-TOPO/OWL1-TGA wurden die in Tabelle 8 angegebenen Primer unter Verwendung von T4 Polynukleotid Kinase von Thermo Fisher Scientific gemäß Herstellerangabe phosphoryliert. Daraufhin wurde eine PCR mit Phusion High-Fidelity DNA Polymerase, siehe 2.2.2.9, mit anschließender Auftrennung und Aufreinigung des PCR-Produktes durchgeführt. Das Produkt wurde unter Verwendung von T4 DNA Ligase gemäß Herstellerprotokoll ligiert und anschließend in gefrierkompetente *E. coli*-Zellen, siehe 2.2.2.3, transformiert. Die Plasmidpräparation aus den *E. coli*-Zellen erfolgte wie in 2.2.2.4 beschrieben, die DNA wurde anschließend vom Sequencing Service der Fakultät für Biologie auf ihre Richtigkeit überprüft.

**Tabelle 8:** Für die Mutagenese verwendete Primer. Fw: Vorwärtsprimer, rev: Rückwärtsprimer

Oligoname	Sequenz 5`-3`
OWL1 QPD fw	5'-ATC CAA TCT CCT CAG ATG AAG G-3'
OWL1 QPD rev	5'-CTT GTC AGG AAG ATA AAC TTG AG-3'

#### 2.2.2.13 Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation

Die Zielgene wurden mithilfe des In-Fusion® HD Cloning Kit (Clontech® Laboratories, Inc.) gemäß Herstellerangabe in die Zielvektoren pBiFC 3 BamHI CP SalI mRFPN und pBiFC 4 BamHI CP SalI mRFPC (Zilian et al. 2011) kloniert. Die verwendeten Primer sind Tabelle 9 zu entnehmen.

**Tabelle 9:** Liste der für die Klonierungen verwendeten Primer. Fw: Vorwärtsprimer, rev: Rückwärtsprimer

Oligoname	Sequenz 5`- 3`
OWL1 fw BiFC	5'-GGA GAT ATA ACA ATG ATG GGC CAA GAA GCA GCT C-3
OWL1 rev SAL BiFC	5'-TCC ACC TCC GTC GAC CTG GCC TTC TTG TGG TAT AC-3'
HFR1 fw BiFC	5'-GGA GAT ATA ACA ATG TCG AAT AAT CAA GCT TTC ATG G-3'
HFR1 rev SAL BiFC	5'-TCC ACC TCC GTC GAC TAG TCT TCT CAT CGC ATG GG-3'
HSP81-2 fw BiFC	5'-GGA GAT ATA ACA ATG GCG GAC GCT GAA ACC TTT G-3'
HSP81-2 rev SAL BiFC	5'-TCC ACC TCC GTC GAC GTC GAC TTC CTC CAT CTT GC-3'
WAV2 fw BiFC	5'-GGA GAT ATA ACA ATG GTG ACG TAC GTG AGC GCG TTG-3'
WAV2 rev SAL BiFC	5'-TCC ACC TCC GTC GAC CCT TCC TGT ATC TTC TTT CC-3'
HSP70-3 fw BiFC	5'-GGA GAT ATA ACA ATG GCT GGT AAA GGA GAA GGT CCA G-3'
HSP70-3 rev BiFC	5'-TCC ACC TCC GTC GAC GTC GAC TTC CTC AAT CTT GGG-3'
HSP70-1 fw BiFC	5'-GGA GAT ATA ACA ATG TCG GGT AAA GGA GAA GGA C-3'
HSP70-1 rev BiFC	5'-TCC ACC TCC GTC GAC GTC GAC CTC CTC GAT CTT AG-3'

AT HOOK fw BiFC	5'-GGA GAT ATA ACA ATG GAT CCT AAC GAA AGC CAC CAT C-3'
AT HOOK rev BiFC	5'-TCC ACC TCC GTC GAC ATC CGG TAT TTG CTG CTC G-3'
HOMEBOX 8 fw BiFC	5'-GGA GAT ATA ACA ATG GGA GGA GGA AGC AAT AAT AGT C-3'
HOMEBOX 8 rev BiFC	5'-TCC ACC TCC GTC GAC TCA TAT AAA AGA CCA GTT GAG G-3'
MYB-LIKE fw BiFC	5'-GGA GAT ATA ACA ATG ATT CCA AGT ATG GAG GGA GG-3'
MYB-LIKE rev BiFC	5'-TCC ACC TCC GTC GAC TAG AGT CAG ATC CAG AGT ACT C-3'
ZINC FINGER1 fw BiFC	5'-GGA GAT ATA ACA ATG GAA CCG TCC ATC AAA GGA GAT C-3'
ZINC FINGER1 rev BiFC	5'-TCC ACC TCC GTC GAC TAG CTT AAG AGT CAA GTC AAT T-3'
GST TAU22 fw BiFC	5'-GGA GAT ATA ACA ATG GCG GAT GAA GTG ATA CTT TT-3'
GST TAU22 rev BiFC	5'-TCC ACC TCC GTC GAC GAC ACA GTA TAT CTT CCT AAT C-3'
PIF1 fw BiFC	5'-GGA GAT ATA ACA ATG CAT CAT TTT GTC CCT GAC TTC-3'
PIF1 rev BiFC	5'-TCC ACC TCC GTC GAC ACC TGT TGT GTG GTT TCC G-3'

#### 2.2.2.14 Kompetenzinduktion von Hefezellen

*Saccharomyces cerevisiae*-Zellen wurden auf einer Petrischale mit YPAD-Festmedium ausgestrichen und bei 30 °C über Nacht wachsen gelassen. Eine Hefe-Kolonie wurde am nächsten Tag in 50 ml YPAD-Flüssigmedium übertragen und über Nacht bei 30 °C geschüttelt (160 UpM). 2 ml der Zellsuspension werden zu 200 ml frischem YPAD-Flüssigmedium gegeben und nochmals bei 30 °C bis zu einer OD<sub>600</sub>=0,1 geschüttelt. Die Kultur wurde 5 min bei 4000 g und Raumtemperatur abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 10 ml sterilem Wasser resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation (5 min, 4000 g, RT) wurden die Zellen in 800 µl Li-Lösung (150 µl 1 M Lithium-Acetat, 150 µl 10x TE-Puffer pH 8.0, mit ddH<sub>2</sub>O auf 1,5 ml aufgefüllt) resuspendiert, aliquotiert und bei -80 °C aufbewahrt.

## 2.2.2.15 Transformation von Hefezellen

Die Ansätze aus 200 ng Plasmid-DNA (verwendete Konstrukte sind Tabelle 10 zu entnehmen), 100 µl kompetenten Hefezellen und 1,2 ml PEG-Lösung (120 µl 1 M Li-Acetat, 120 µl 10x TE-Puffer, 960 µl 50%iges PEG<sub>4000</sub>) wurden für 30 min bei 30 °C geschüttelt und im Anschluss für 20 min bei 42 °C inkubiert. Nach kurzem Abzentrifugieren (10 s, 4000 g) wurde der Überstand verworfen und die Hefezellen in 200 µl 1x TE-Puffer pH 7,5 resuspendiert. Der Ansatz wurde auf SC-Aminosäuremangelmedium ausplattiert und für 4 Tage bei 30 °C inkubiert. Durch das Mangelmedium konnten nur die Kolonien wachsen, die das Plasmid aufgenommen haben und somit zur Synthese der fehlenden Aminosäure fähig waren.

**Tabelle 10:** Liste der für das Hefe-2-Hybrid-System verwendeten Konstrukte. OWL1 JD: Aminosäure 15-83, OWL1 CT: 389-534, HFR1 HLH: 135-188

Konstrukt	DNA-Binde- oder Aktivierungsdomäne
<i>OWL1</i> / pDEST32	GAL-DB
<i>OWL1ΔCT</i> / pDEST32	GAL-DB
<i>OWL1ΔJD</i> / pDEST32	GAL-DB
<i>HFR1</i> / pDEST22	GAL-AD
<i>HFR1ΔNT</i> / pDEST22	GAL-AD
<i>HFR1ΔCT</i> / pDEST22	GAL-AD
<i>HFR1ΔNT, ΔHLH</i> / pDEST22	GAL-AD
<i>HSP81</i> / pDEST22	GAL-AD
<i>PRMT4a</i> / pDEST22	GAL-AD
<i>WAV2</i> / pDEST22	GAL-AD

#### 2.2.2.16 Plasmidpräparation aus Hefezellen mit dem QIAprep® Spin Miniprep Kit (Qiagen)

Kolonien der transformierten Hefezellen wurden in 5 ml YPAD-Flüssigmedium angeimpft und über Nacht bei 30 °C schütteln gelassen. 4 ml dieser Flüssigkulturen wurden abzentrifugiert, mit 250 µl Puffer P1 und 20 µl 50%iger Glaskugelsuspension (Glas-Perlen 300 µm (Sigma), gewaschen, in TE-Puffer) versetzt und 5 min gevortext. Im Anschluss wurden 250 µl Puffer P2 dazugegeben, sechsmal invertiert, 350 µl Puffer N3 hinzugefügt und erneut sechsmal invertiert. Nach 30 min Inkubation bei RT wurden die Proben zentrifugiert (10 min, 13000 g) und der Überstand auf eine QIAprep spin column gegeben. Es wurde erneut zentrifugiert (1 min, 13000 g) und der Durchfluss verworfen. Nach Zugabe von 750 µl Puffer PE und einem weiteren Zentrifugationsschritt (30 s, 13000 g), wurde die leere Säule zentrifugiert (1 min, 13000 g) und die Plasmide anschließend in 50 µl Puffer PB eluiert (Zentrifugation 1 min, 13000 g).

Die darauffolgende DNA Behandlung mit Restriktionsendonukleasen, Polymerasekettenreaktion und Auftrennung von DNA mittels Gelelektrophorese wurden wie in Abschnitt 2.2.2.8- 2.2.2.10 beschrieben durchgeführt.

#### 2.2.2.17 Hefe-Zwei-Hybrid-Screen

Die transformierten Hefezellen wurden in 3 ml YPAD-Flüssigmedium angeimpft und über Nacht bei 30 °C schütteln gelassen. Am nächsten Tag wurden 2 ml kurz abzentrifugiert (30 s, 4000 g, RT) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 2 ml einer 0,9%igen NaCl-Lösung resuspendiert und erneut kurz abzentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, das Pellet in 0,9%iger NaCl-Lösung resuspendiert, die OD<sub>600</sub> bestimmt und mit der NaCl-Lösung auf 0,05 eingestellt. Dann wurden 1:10 und 1:50 Verdünnungen hergestellt und jeweils 2,5 µl davon auf SC-Leu-Trp-His Platten und 3AT Platten (5 mM, 10 mM, 20 mM, 25mM 3AT) getropft. Es erfolgte eine Inkubation von drei Tagen bei 30 °C, anschließend wurde das Wachstum der Kolonien ausgewertet.

### 2.2.3 Biochemische Methoden

#### 2.2.3.1 Proteinüberexpression in *E.coli*

Die heterologe Expression rekombinanter Proteinen wurde in *E. coli* Zellen des Stammes BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL durchgeführt. Die mit den Plasmiden (verwendete Konstrukte

sind Tabelle 11 zu entnehmen) transformierten Zellen wurden unter Antibiotikaselektion bis zu einer  $OD_{600}=0,6$  bei 37 °C in LB-Medium angezogen. Die Induktion der Proteinexpression wurde durch Zugabe von 1 mM IPTG gestartet und anschließend erfolgte die Expression für 3-6 h bei 37 °C. Danach wurden die *E. coli* Zellen durch Zentrifugation für 20 min bei 4000 g gesammelt, der Überstand verworfen und das Zellpellet entsprechend des jeweiligen Versuches weiterverwendet oder bei -20 °C aufbewahrt. Die Proteinüberexpression von OWL1 erfolgte nach IPTG Zugabe für 16 h bei 16 °C.

**Tabelle 11:** Liste der für die Proteinüberexpression verwendeten Konstrukte.

Konstrukt	Funktion
<i>OWL1/pGEX</i>	N-terminale GST Fusion
<i>HFR1/pEXP</i>	N-terminale 6xHIS-Fusion

#### 2.2.3.2 Denaturierender Bakterienaufschluss

Das Pellet der sedimentierten Bakterien nach der Überexpression wurde in 20 ml Lysepuffer (150 mM NaCl, 50 mM TrisHCl pH 8) resuspendiert. Mithilfe des M-110L Microfluidizer® (Microfluidics, Newton, USA) wurden die Zellen gemäß Herstellerprotokoll unter Druck aufgeschlossen. Anschließend wurde die Suspension dreimal je 30 s bei 40 V auf Eis mit Ultraschall sonifiziert. Die aufgeschlossenen Zellen wurden bei 14000 g für 20 min bei 4 °C zentrifugiert. Das Pellet, bestehend aus unlöslichen, aggregierten Proteinen in Form von „inclusion bodies“, wurde in 20 ml Lyse-Puffer resuspendiert und wieder pelletiert (6000 g, 10 min, RT). Anschließend wurde das Pellet in 20 ml Inclusion-Body-Solubilisierungspuffer (8 M Harnstoff, 50 mM TrisHCl pH 8, 1 mM DTT, 1 mM EDTA) aufgenommen und 1 h bei RT geschüttelt. Durch erneute Zentrifugation (6000 g, 10 min, RT) wurden unlösliche Bestandteile sedimentiert. Der Überstand wurde in einen Dialyseschlauch überführt.

#### 2.2.3.3 Dialyse zur Rückfaltung denaturierter Proteine

Der Dialyseschlauch (SERVAPOR, Ø 16 mm, Serva) wurde vor dem Befüllen 1 h in Lyse-Puffer äquilibriert. Die Probe mit den in Harnstoff denaturierten Proteinen wurde in den Dialyseschlauch gefüllt und eine Stunde bei Raumtemperatur in 1 l Lysepuffer (mit zusätzlich 2,5 % Glycerin, 0,1 % Triton, 4 M Harnstoff) unter leichtem Rühren inkubiert. Anschließend wurde die Probe zweimal in je einem Liter Lysepuffer (2,5 % Glycerin, 0,1 % Triton,

2 M Harnstoff) und daraufhin in 1 l Lysepuffer ohne Harnstoff inkubiert. Der letzte Dialyseschritt erfolgte bei 4 °C in 1 l Lysepuffer ohne Harnstoff über Nacht. Am nächsten Tag wurde die Probe bei 10000 g für 15 min bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand weiterverwendet.

#### 2.2.3.4 Pull-Down-Assay

Um Protein-Protein-Interaktionen *in vitro* nachzuweisen, wurde der „Pull-Down-Assay“ verwendet. Hierzu wurde zuerst die Matrix äquilibriert. Für einen Ansatz wurden 200 µl Ni-NTA Agarose (Qiagen) dreimal mit je 10 ml Lysepuffer kurz inkubiert, bei 1000 g für eine Minute abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Der dialysierte Extrakt der beiden Proteine, deren Interaktion nachgewiesen werden sollte, wurde zu der Matrix gegeben und für 2 h unter Rollen bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde die Ni-NTA-Agarose durch Zentrifugation (15 s, 1000 g) sedimentiert und viermal mit jeweils 10 Volumina Waschpuffer (50 mM TrisHCl pH8, 150 mM NaCl, 20 mM Imidazol, 1 mM PMSF) gewaschen, wobei der Überstand jedes Mal aufbewahrt wurde. Zuletzt wurde dreimal mit 0,5 Volumina Elutionspuffer 1 (50 mM TrisHCl pH 8, 300 mM NaCl, 100 mM Imidazol) und einmal mit 0,5 Volumina Elutionspuffer 2 (50 mM TrisHCl pH8, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol) eluiert. In jedem Schritt wurde der Überstand aufbewahrt und die Proteine konnten anschließend versetzt mit 4x SDS-Beladungspuffer (200 mM TrisHCl pH 6,8, 8% SDS, 40% Glycerin, 0,4% Bromphenolblau, 10% β-Mercaptoethanol) auf einer SDS-PAGE aufgetrennt und durch Western-Transfer und anschließende Immunodetektion analysiert werden.

#### 2.2.3.5 Proteinextraktion aus Pflanzenmaterial

Gefrorenes Pflanzenmaterial wurde in 2x Laemmli-Puffer (200 mM TrisHCl pH 6,8, 4% SDS, 20% Glycerin, 5% β-Mercaptoethanol) homogenisiert und für 15 min bei 65 °C solubilisiert. Nach einem Zentrifugationsschritt (14000 g, 10 min, RT) wurde der Überstand 5 min auf 95 °C erhitzt, um die Proteine zu denaturieren. Diese konnten anschließend durch SDS-PAGE analysiert werden.

#### 2.2.3.6 Proteinauftrennung über SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine wurden über SDS-Polyacrylamid-Gele (SDS-PAGE) mit 10%-12,5% Acrylamid aufgetrennt (Laemmli 1970). Es wurde eine „Mini-Gel-Apparatur“ der Firma BioRad verwendet. Die Herstellung der Gele und Auftrennung der Proteine erfolgte gemäß dem Herstellerprotokoll.

#### 2.2.3.7 Coomassiefärbung

Das Gel wurde nach der Elektrophorese für 30 min in einer Färbelösung (30% Ethanol, 10% Essigsäure, 0,2% Coomassie Brilliant Blau R250) geschwenkt. Anschließend wurde das Gel in einer Entfärbelösung (40% (v/v) Methanol, 7% (v/v) Essigsäure) geschwenkt, bis die Proteinbanden deutlich zu erkennen waren.

#### 2.2.3.8 Westernblot und Immunodetektion

Der Nasstransfer wurde in einer „Mini Trans-Blot“ Apparatur der Firma BioRad durchgeführt. Der Aufbau wurde gemäß dem Protokoll des Herstellers durchgeführt, die PVDF Membran der Firma GE Healthcare wurde durch Methanol aktiviert. Der Transfer erfolgte unter der Verwendung von Transferpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20% Methanol) bei einer Stromstärke von 300 mA für 70 min. Für die spezifische Identifizierung eines Antigens wurde die Membran für 45 min in Blockierungspuffer ((0,1% Tween 20, 4% (w/v) Magermilchpulver) in 1x TBS-Puffer (50 mM Tris, 150 mM NaCl<sub>2</sub>, pH 7,6)) abgesättigt und anschließend über Nacht bei 4 °C mit einem spezifischen primären Antikörper (Verdünnung mit Blockierungspuffer ist Tabelle 3 zu entnehmen) inkubiert. Überschüssiger Antikörper wurde dann durch dreimaliges Waschen für jeweils 15 min in TBS-T-Puffer (0,1% Tween 20 in 1x TBS-Puffer) entfernt. Anschließend wurde die Membran mit sekundärem Antikörper (gemäß Herstellerangabe verdünnt mit Blockierungspuffer) für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde wiederum überschüssiger Antikörper durch dreimaliges Waschen für jeweils 10 min mit TBS-T-Puffer entfernt. Das Entwickeln wurde mit dem „Enhanced chemiluminescence“ (ECL)–Kit von Thermo Scientific Pierce nach Herstellerangaben durchgeführt.



#### 2.2.3.9 „Crosslink“-Versuch

Frisch geerntete *A. thaliana* Blätter wurden für 30 min in „Crosslink“-Lösung (20 mM DSP (Dithiobis(succinimidylpropionat)) in DMSO, verdünnt auf 2 mM in PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4)) geschwenkt. Die Stop-Lösung (1 M TrisHCl pH 7,5) wurde zu einer finalen Konzentration von 20 mM zugegeben und die Probe nochmals für 15 min inkubiert. Anschließend wurde die Probe mithilfe von magnetischen Agarose-Beads (GFP-Trap® (Chromotek)) nach Herstellerprotokoll aufgereinigt und die darin enthaltenen Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Gel-Bande, welche Proteine ab einer Größe von 86 kDa (59 kDa OWL1+ 27 kDa GFP) beinhaltete, wurde ausgeschnitten und mittels Massenspektrometrie analysiert. Diese wurde vom Bereich Proteomics der Serviceeinheit MSBioLMU durchgeführt. Es wurde ein LTQ Orbitrap Massenspektrometer (Thermo) mit vorgeschaltetem nano LC verwendet. Für die Proteinanalytik wurde standardmäßig eine RP C18 Kapillarsäule verwendet. Die erhobenen Daten wurden mittels gerätespezifischen Auswerteprogrammen wie dem Proteom Discoverer prozessiert und ausgewertet. Abschließend wurden die Ergebnisse gegen eine Kontrolle und die vorhergesagte Lokalisation bereinigt.

#### 2.2.4 Zellbiologische Methoden

##### 2.2.4.1 Agrobakterien-vermittelte Transformation von *A. thaliana*

Eine in LB-Selektionsmedium gewachsene Übernachtskultur von transformierten Agrobakterien wurde bei einer OD<sub>600</sub>=0,8 bei 3600 g und 4 °C für 10 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde daraufhin in 500 ml Infiltrationslösung (5% Saccharose, 0,05% Silvett-L-77 in ddH<sub>2</sub>O) resuspendiert. Die Blütenstände der zu transformierenden Pflanzen (*owl1* und Col-0) wurden für 20 s in die Lösung eingetaucht. Die Pflanzen wurden für zwei Tage unter wenig Licht feucht gehalten und anschließend bis zur Samenreife weiterkultiviert.

##### 2.2.4.2 Transiente Transformation von *Nicotiana benthamiana* Blättern

Mit verschiedenen splitRFP-Konstrukten (Klonierung siehe Abschnitt 2.2.2.12) transformierte *A. tumefaciens* GV3101 wurden über Nacht in 10 ml LB-Medium bei 28 °C unter Selektion durch Kanamycin/Gentamycin/Rifampicin angezogen. Anschließend wurden die Agrobakterien für 15 min bei 4000 g pelletiert und in Agromix (10 mM MES-KOH pH 5,6, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 150 µM Acetosyringon, 3% Saccharose) auf eine OD<sub>600</sub>=1 eingestellt. Für die

Doppeltransformation wurden die Zellen aus beiden Proben anschließend gemischt. Dann wurden die Bakterien für 2 h bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln im Dunkeln inkubiert und anschließend in Blätter von 3-4 Wochen alten *N. benthamiana* Pflanzen infiltriert. Hierfür wurde die Bakteriensuspension mittels einer Injekt<sup>®</sup>-F Spritze (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) an der abaxialen Blattseite appliziert. Die behandelten Pflanzen wurden gut befeuchtet und über Nacht im Dunkeln stehen gelassen. Danach wurden sie für 36 h unter normalen Lichtbedingungen im Gewächshaus inkubiert. Anschließend wurden aus den Blättern Protoplasten isoliert und mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert.

#### 2.2.4.3 Protoplastenisolation aus *N. benthamiana*

1 g infiltrierte Tabakblätter wurden mit einer Rasierklinge angeschnitten und mit 10 ml Enzymlösung (F-PIN, 0,1 g Cellulase, 0,03 g Mazerase) dreimal jeweils 30 s vakuuminfiltriert. Der Ansatz wurde für 2 h bei 40 UpM abgedunkelt geschwenkt, bis die Lösung grün wurde. Anschließend wurden die Protoplasten bei 80 UpM für eine weitere Minute geschwenkt. Die Protoplasten-Suspension wurde durch 100 µm Nylon-Netz in 15 ml Kulturröhrchen gefiltert und vorsichtig mit 2 ml F-PCN überschichtet. Der Ansatz wurde 10 min bei 70 g zentrifugiert und die Bande in der Zwischenschicht, die die intakten Protoplasten enthielt, vorsichtig mit abgeschnittener Pipettenspitze abgenommen. Diese wurden nun in 10 ml Transformationsmedium resuspendiert und erneut für 10 min bei 50 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 400 µl F-PCN resuspendiert. Die Protoplasten konnten nun mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert werden.

Die verwendeten Lösungen wurden folgendermaßen hergestellt:

F-PCN (1000 ml): 100 ml 10x Macro MS-modifiziert, 10 ml 2 M NH<sub>4</sub>-Succinat, 1 ml 1000x Micro MS, 2 ml 500x PC Vitamine, 1952 mg MES, mit ca. 80 g Glukose auf 550 mOsm eingestellt, pH 5,8, sterilfiltriert

F-PIN (1000ml): 100 ml 10x Macro-MS-modifiziert, 10 ml 2 M NH<sub>4</sub>-Succinat, 1ml 1000x Micro MS, 2 ml 500x PC Vitamine, 1952 g MES, mit ca. 120 g Saccharose auf 550 mOsm eingestellt, pH 5,8, sterilfiltriert

Transformationspuffer (1000 ml): 3,05 g  $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ , 1 g MES, mit ca. 90 g Mannitol auf 550 mOsm eingestellt, pH 5,8, autoklaviert

Macro MS-modifiziert (10x) (100 ml): 1012 mg  $\text{KNO}_3$ , 440 mg  $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ , 370 mg  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ , 170 mg  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

Ammoniumsuccinat (2 M) (100 ml): 23,6 g Bernsteinsäure, 10,6 g  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , mit ca. 22,4 g KOH-Plätzchen pH auf 5,8 eingestellt, sterilfiltriert

#### 2.2.4.4 Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation

Mithilfe des BIFC-Assays wurde die Interaktion verschiedener Proteine untersucht. Die Konstrukte wurden wie in 2.2.2.12 beschrieben kloniert, sie beinhalteten entweder ein RFPN oder ein RFPC. *N. benthamiana* Blätter wurden mit jeweils einem Konstrukt mit RFPN und einem Konstrukt mit RFPC infiltriert (siehe Abschnitt 2.2.4.2). Bei einer Interaktion der beiden zu testenden Proteine kam es zu einer Fluoreszenz des RFPs, was mithilfe von Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen werden konnte.

#### 2.2.4.5 Fluoreszenzmikroskopie

Die Analyse durch Fluoreszenzmikroskopie erfolgte mit dem Lichtmikroskop Axio Imager Z1 von Zeiss (Jena, Deutschland). Die Auswertung der Bilder erfolgte mit der integrierten Analysesoftware AxioVision. Die Anregung von GFP und RFP erfolgte bei 488 nm bzw. 564 nm. Die Signale wurden bei 509 nm (GFP) und 581 nm (RFP) detektiert.

### 2.2.5 Physiologische Untersuchungsmethoden

Für die folgenden Versuche wurden LED-Platten (Quantum devices und PVP GmbH) mit einem Emissionsmaximum von  $\lambda = 740 \text{ nm}$  als Dunkelrotlichtquelle und  $\lambda = 660 \text{ nm}$  als Rotlichtquelle eingesetzt. Als Weißlichtquelle dienten Leuchtstoffröhren (FH 21W/ 830, Osram).

#### 2.2.5.1 Bestimmung der Keimungsrate nach Bestrahlung mit Dunkelrotlicht

Zur Bestimmung der Keimfähigkeit verschiedener *A. thaliana* Linien unter Niedrigst-Fluenz-Bedingungen wurde die Samen wie zuvor beschrieben sterilisiert und auf  $\frac{1}{2}\text{MS}$ -Festmedium ausgelegt. Unmittelbar nach dem Auslegen wurden die Platten für 45 min mit dunkelrotem

Licht ( $FR\ 0,5\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) bestrahlt um in der aktiven  $P_{FR}$ -Form vorhandenes phyB in die inaktive  $P_R$ -Form umzuwandeln. Anschließend wurden die Samen im Dunkeln bei RT inkubiert. Um die Keimfähigkeit unter Dunkelrotlicht zu überprüfen wurden die Samen für 48 h im Dunkeln inkubiert und dann erneut ein 30-minütiger Dunkelrotlichtpuls gegeben. Nach erneuter Inkubation im Dunkeln für 72 h wurde die Keimungsrate ermittelt, wobei alle Samen mit herausgewachsener Wurzel als gekeimt gewertet wurden. Als Negativkontrolle wurden Samen nach dem ersten Dunkelrotlichtpuls für 5 Tage im Dunkeln inkubiert, als Positivkontrolle wurden Samen direkt nach dem Auslegen für 5 Tage mit Weißlicht bestrahlt. Zur Auswertung wurde die Dunkelkeimungsrate von der Keimung unter Dunkelrotlicht abgezogen und das Ergebnis als prozentualer Anteil an der Keimung unter Weißlicht, welche auf 100% gesetzt wurde, dargestellt.

#### 2.2.5.2 Bestimmung der Hypokotylllänge nach Bestrahlung mit verschiedenen Lichtbedingungen

Die benötigte Menge an Samen wurde sterilisiert und auf  $\frac{1}{2}$ MS-Festmedium ausgelegt. Die Samen wurden für 4 Tage bei 4 °C stratifiziert und anschließend für 6 h mit Weißlicht bestrahlt, um eine gleichmäßige Keimung zu gewährleisten. Daraufhin wurden die Samen über Nacht im Dunkeln bei Raumtemperatur aufbewahrt und anschließend in die jeweilige Lichtbedingung überführt. Um Niedrigst-Fluenzen zu simulieren, wurde für 3 Tage die Inkubation im Dunkeln durch einen 5-minütigen Dunkelrotlichtpuls der Stärke  $0,4\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  pro Stunde unterbrochen. Kontinuierliches Dunkelrotlicht wurde für 3 Tage mit einer Intensität von  $0,2\text{-}1,2\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  appliziert, kontinuierliches Rotlicht mit einer Intensität von  $1\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Die Dunkelkontrolle wurde für 3 Tage im Dunkeln aufbewahrt. Anschließend wurden die Keimlinge auf einer Petrischale mit MS-Festmedium der Länge nach ausgelegt, mit einer Digitalkamera fotodokumentiert und mit dem Computerprogramm „ImageJ“ (NIH) die Länge der Hypokotyle gemessen.

#### 2.2.5.3 Bestimmung der agravitropischen Ausrichtung von Keimlingen unter Dunkelrotlicht

Sterilisierte *A. thaliana* Samen wurden auf rechteckigen Petrischalen mit  $\frac{1}{2}$ MS-Festmedium ausgelegt. Dabei wurden die Samen auf einer geraden Linie in ausreichendem Abstand (5 mm) zueinander platziert. Anschließend wurden die Samen wie bereits beschrieben einer Kälteperiode und einem Weißlichtpuls ausgesetzt und anschließend für 24 h im Dunkeln bei RT inkubiert. Für den eigentlichen Lichtversuch wurden die Platten so mit dunklem Tonpapier umhüllt, dass nur eine Seite, parallel zur Samenreihe, frei blieb. Mit dieser offenen Seite nach

oben wurden die Platten senkrecht unter die Dunkelrotlichtquelle gestellt und für drei Tage mit Dunkelrotlichtpulsen ( $5 \text{ min/ h } 0,4 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) bestrahlt. Anschließend wurden die Platten fotografiert und der Winkel zwischen Vertikaler und Hypokotyl mit dem Programm „ImageJ“ (NIH) vermessen. Keimlinge, die absolut negativ gravitropisch, also entgegen der Schwerkraft wuchsen, wurden nicht in die Auswertung einbezogen. Zuletzt wurden die Varianzen = Standardabweichung  $s^2$  berechnet. Diese wurden durch Verwendung des F-Tests (Varianzquotiententest) verglichen, um signifikante Unterschiede aufzuzeigen. Voraussetzung hierfür waren, dass die Grundgesamtheiten, aus denen die Stichproben entnommen wurden, normalverteilt, die Stichproben unabhängig und die Messwerte intervallskaliert sind (Köhler, Schachtel, Voleske: Biostatistik, S.94ff).

#### 2.2.5.4 Bestimmung des Blühzeitpunktes

*A. thaliana* Samen wurden auf Erde ausgelegt und für zwei Tage bei  $4^\circ\text{C}$  stratifiziert. Anschließend wurden die verschiedenen Linien im Gewächshaus unter Langtagbedingungen (16 h WL/ Tag) und unter Kurztagbedingungen (8 h WL/ Tag) bis zum Erscheinen der Infloreszenz angezogen. Die Anzahl der Tage bis zum Erscheinen der Blüte wurde mit der des Wildtyps verglichen.

#### 2.2.5.5 Statistische Untersuchungen

Versuche wurden mindestens dreimal durchgeführt. Wurde ein repräsentatives Experiment gezeigt, so wurden in mindestens zwei weiteren Experimenten vergleichbare Ergebnisse erzielt. Die statistische Signifikanz wurde mittels T-oder F-Test verifiziert.

#### 2.2.6 Computerprogramme

Zur Sequenzanalyse wurde das Programm Vector NTI® (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Durch das Blast Programm von NIH konnten DNA- und Proteinsequenzen mit einer Datenbank verglichen werden. Image J (NIH) wurde als Bildbearbeitungs- und Messprogramm verwendet.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Charakterisierung von OWL1

OWL1 ist eine Komponente der VLFR Signaltransduktion. *Owl1-1* wurde von PD Dr. Cordelia Bolle in einem „Screen“ von Mutanten unter schwachem kontinuierlichen DR-Licht isoliert (Bolle et al. 2000). Mithilfe dieses „Screens“ wurde nach *A. thaliana* Pflanzen gesucht, die einen Defekt in der phyA Signaltransduktion aufweisen. *Owl1-1* fiel durch ein geringfügig verlängertes Hypokotyl sowie einen eingeschränkten „Far-red-Killing“ Effekt auf. Anschließend wurde die Mutante im Rahmen der Diplomarbeit von Volker Wachtler und der Doktorarbeit von Julia Kneissl physiologisch und biochemisch charakterisiert und die Interaktion mit HFR1, einem bHLH-Protein, welches an der phyA-abhängigen HIR beteiligt ist, nachgewiesen (Kneissl et al. 2009). Im Rahmen dieser Arbeiten wurden ein Anti-OWL1-Antikörper in Mäusen, eine OWL1- Überexpressionslinie mit einem 35S-Promoter (*OWL1-OE*), die *owl1* x *hfr1* Doppelmutante und die Mutante *OWL1-OE* x *hfr1* hergestellt. Diese wurden für die vorliegende Arbeit verwendet.

##### 3.1.1 Mutagenese des aktiven Zentrums der J-Domäne

OWL1 gehört zur Familie der J-Proteine. Diese besteht aus molekularen Chaperonen, welche wichtig für das Assemblieren und Falten von Proteinen sind. Viele Chaperone sind Hitze-Schock-Proteine (HSP). Die J-Proteine gehören zur Familie der HSP40, mit der sie die J-Domäne gemeinsam haben. HSP40 regulieren die Aktivität von HSP70, indem sie mit deren ATPase-Domäne interagieren (Genevaux et al. 2002). Die J-Domäne selbst ist hochkonserviert und wurde zum ersten Mal in Hitze-Schock-Proteinen identifiziert. Sie liegt N-terminal und besteht aus 4  $\alpha$ -Helices. Zwischen der zweiten und dritten Helix liegt ein HisProAsp (HPD) Tripeptid, welches das aktive Zentrum der J-Domäne bildet (Walsh et al. 2004). Um zu überprüfen, ob OWL1 mithilfe der J-Domäne mit anderen Proteinen interagiert, wurde diese mutagenisiert. Das Histidin des HPD Motivs wurde durch Leucin ersetzt, das auf das HPD-Motiv folgende Lysin wurde entfernt (siehe Abbildung 4).

ELYALLNLSPEASDEEIRKAYRQWAQVYHPDKIQSPQMKEVATENFQRICEAYEILSDETKRLIYDLYG  
 ELYALLNLSPEASDEEIRKAYRQWAQVYLPDIQSPQMKEVATENFQRICEAYEILSDETKRLIYDLYG

**Abbildung 4:** Aminosäuresequenz der J-Domäne von OWL1. In Rot hervorgehoben ist das HPD-Motif. Durch Mutagenese wurde das Histidin durch Leucin ersetzt und das anschließende Lysin entfernt. Die Veränderungen sind rot markiert und die mutagenisierte Aminosäuresequenz ist in Grün dargestellt.

Ursprünglich sollte das Histamin durch Glutamin ersetzt werden (QPD), da für diese Mutation in *E. coli* ein signifikanter Phänotyp nachgewiesen werden konnte (Genevaux et al. 2002). Deswegen wird die Mutation in dieser Arbeit als QPD bezeichnet.

### 3.1.2 Molekulare Charakterisierung der Mutante *owl1*

In *owl1-1* ist der offene Leserahmen des Gens durch eine T-DNA-Insertion unterbrochen. Bei der Linie *owl1-1* handelt es sich um eine Mutante im *A. thaliana* Ökotyp Columbia (Col). *OWL1* (At2g35720) ist auf Chromosom II lokalisiert. Das Gen ist durch eine T-DNA-Insertion im zweiten Exon unterbrochen. Neben *owl1-1* wurde ein weiteres Allel isoliert, *owl1-2*. Da die Linie *owl1-1* jedoch einen stärkeren Effekt aufweist (Kneissl et al. 2009), wurde diese für die vorliegende Arbeit verwendet. Um die Homozygotie der Mutante zu bestätigen wurde genomische DNA isoliert und durch eine PCR-Reaktion das Vorhandensein der Insertion getestet. Hierfür wurden die in Tabelle 5 aufgelisteten Oligonukleotide verwendet. Die Homozygotie der Mutante konnte bestätigt werden (nicht gezeigte Daten).

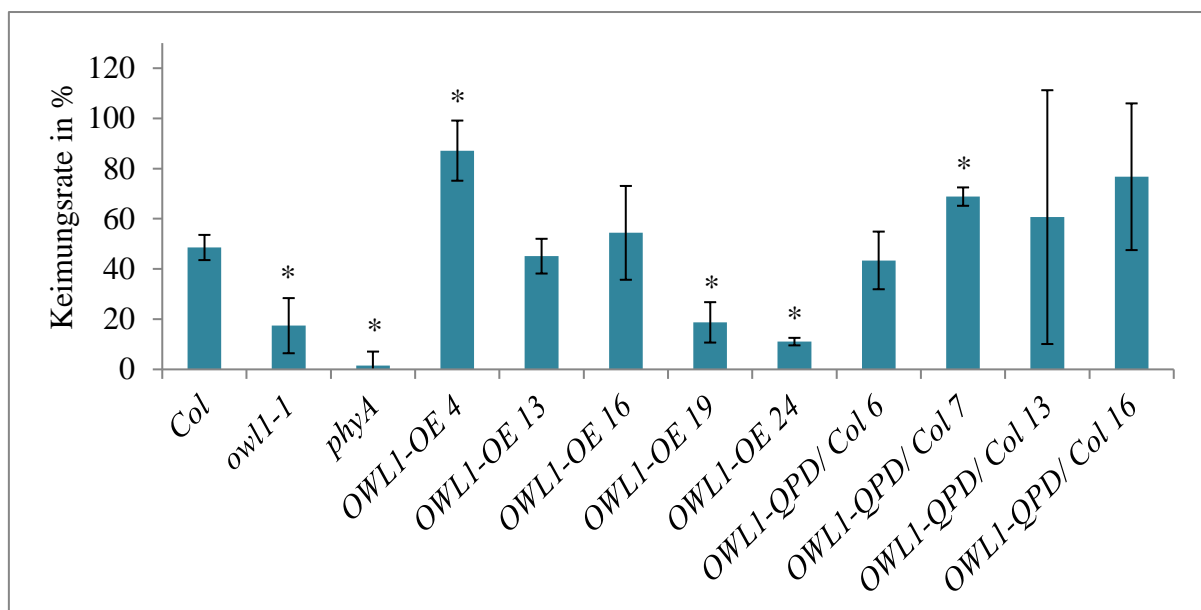
### 3.1.3 Phänotypische Charakterisierung der Mutante *owl1-1* und der Überexpressionslinie *OWL1-OE*

Die Linie *owl1-1* und die Überexpressionslinie *OWL1-OE* wurden phänotypisch charakterisiert. Es wurden die Keimungsrate unter verschiedenen Lichtbedingungen, die Inhibierung der Hypokotylelongation unter verschiedenen Lichtbedingungen, die Zeitspanne bis zur Induktion der Blüte, das agravitropische Wachstum unter Dunkelrotlicht und das Hypokotylwachstum unter „end-of-day far-red“ Bedingungen (EOD FR) untersucht. Um die Rolle von OWL1 in der Lichtsignaltransduktion einordnen zu können, wurden die VLFR und die HIR getestet.

### 3.1.3.1 Keimungsrate unter verschiedenen Lichtbedingungen

Wenn Samen in Kontakt mit Wasser geraten, wird durch das Quellen der Keimungsprozess initiiert. Als finalen Auslöser benötigt *A. thaliana* jedoch Licht. Bereits in den trockenen Samen ist der Rotlicht-Rezeptor phyB zu finden, der die Keimung bei Rotlicht oberhalb eines Schwellenwertes von  $0,1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  auslösen kann. Bei einer Wellenlänge von weniger als 520 nm und mehr als 710 nm wird die Keimung über phyA induziert (Shinomura et al. 1996). Da phyA jedoch im Gegensatz zu phyB erst neu synthetisiert werden muss, wird eine effiziente Keimung erst ca. 48 h nach der Quellung erreicht.

In dem in Abbildung 5 dargestellten Experiment wurden die Samen befeuchtet und anschließend 30 min mit Dunkelrotlicht bestrahlt, um vorhandenes Phytochrom zu inaktivieren. Die Samen wurden für 48 h im Dunkeln inkubiert und anschließend erneut 30 min mit Dunkelrotlicht bestrahlt, um das im Dunkeln gebildete phyA zu aktivieren. So wurde die VLFR angeregt und die Keimung initiiert. Nach weiteren 72 h im Dunkeln wurde die Keimungsrate bestimmt und mit der Dunkelkeimungsrate und der Gesamtkeimungsrate im Weißlicht verglichen.



**Abbildung 5:** Keimungsrate von *owl1-1* Linien. Samen wurden nach dem Auslegen mit Dunkelrotlicht bestrahlt. Anschließend wurden sie 48 h im Dunkeln aufbewahrt und einem erneuten Dunkelrotlichtpuls ausgesetzt (FR<sub>p</sub>). Diese Keimungsrate wurde in Abhängigkeit von der Dunkelkeimungsrate und der Gesamtkeimungsrate im Weißlicht dargestellt. Durch die Fehlerbalken wird die Standardabweichung angegeben. Die mit einem Stern (\*) markierten Säulen zeigen einen signifikanten Unterschied im Vergleich zum Wildtyp (Col).

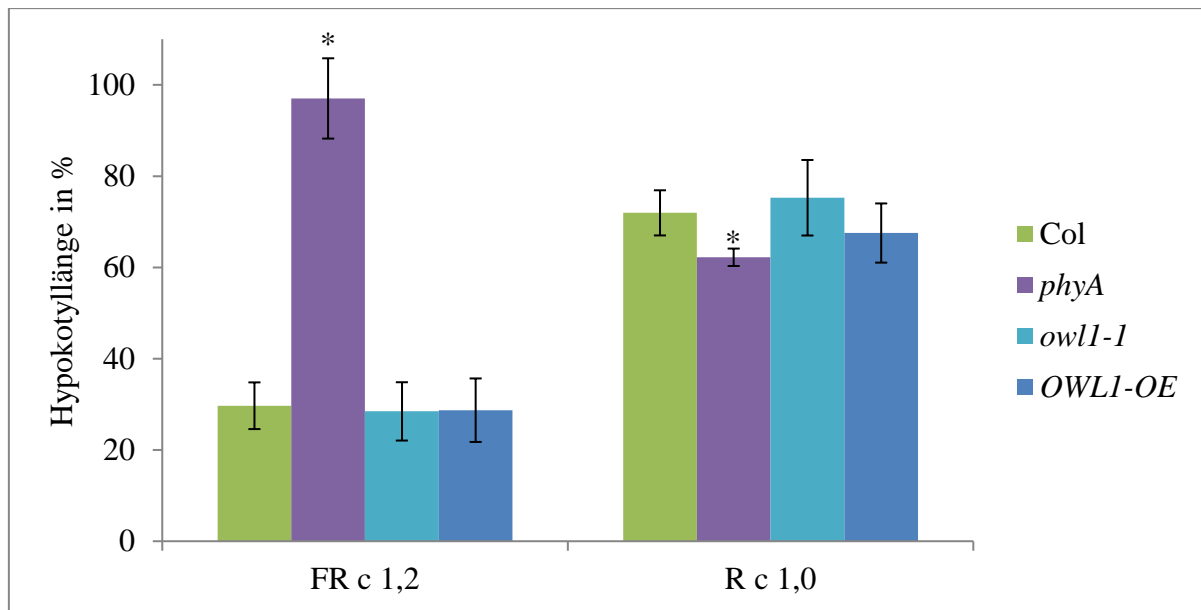


In diesem Experiment konnte für *owl1-1* und *phyA* im Vergleich zu Col eine signifikant verringerte Keimungsrate gezeigt werden. Eine Rolle von PHYA und OWL1 bei der VLFR in Bezug auf die Keimung konnte somit bestätigt werden. Im dargestellten Experiment wurden außerdem die verschiedenen OWL1 Überexpressionslinien *OWL1-OE4*, *13*, *16*, *19* und *24* mit Col, *owl1-1* und *phyA* verglichen. Zusätzlich wurde das mutagenisierte *OWL1-QPD* in Wildtyp transformiert und die verschiedenen Linien *OWL1-QPD/Col* 6, 7, 13 und 16 getestet. Von den Überexpressionslinien keimten *OWL1-OE4* signifikant besser und *OWL1-OE19* und *OWL1-OE24* signifikant schlechter. Eine erhöhte Keimungsrate korreliert mit der Aussage, dass OWL1 Überexpressionslinien bei der Keimung eine gesteigerte Sensibilität auf Dunkelrotlichtpulse zeigen (Kneissl et al. 2009). Verringere Keimung könnte auf ein Gen-„Silencing“ zurückzuführen sein. Dies müsste in weiterführenden Experimenten anhand der RNA überprüft werden. *OWL1-QPD/Col7* zeigte eine signifikant verstärkte Keimung. Auch hier sind durch die Variation der Ergebnisse mehrere Möglichkeiten gegeben: erhöhte Sensibilität auf Dunkelrotlichtpulse durch Überexpression, verringerte Keimung durch Gen-„Silencing“ oder Funktionslosigkeit des OWL1-QPD und dadurch Keimung wie Wildtyp bei *OWL1QPD/Col*.

### 3.1.3.2 Inhibierung der Hypokotylelongation

Um schneller Licht zu erreichen, zeigen etiolierte Keimlinge ein verstärktes Hypokotylwachstum. Bereits durch geringe Lichtmengen kann diese Hypokotylelongation im Rahmen der VLFR teilweise inhibiert werden. Durch die von *phyA* vermittelte HIR und die von *phyB* vermittelte LFR führen höhere Lichtquantitäten zu einem verkürzten Hypokotyl (Nagatani et al. 1993).

Um den Effekt der Mutationen auf die genannten drei Signalwege zu untersuchen, wurden Keimlinge der verschiedenen Linien für drei Tage unter konstantem Rotlicht (LFR), konstantem Dunkelrotlicht (HIR) und Pulsen von Dunkelrotlicht (VLFR, nicht gezeigte Daten, da Wiederholungen nötig) angezogen. Diese Keimlinge wurden anschließend bezüglich der Länge mit Keimlingen verglichen, die im Dunkeln kultiviert wurden (siehe Abbildung 6).



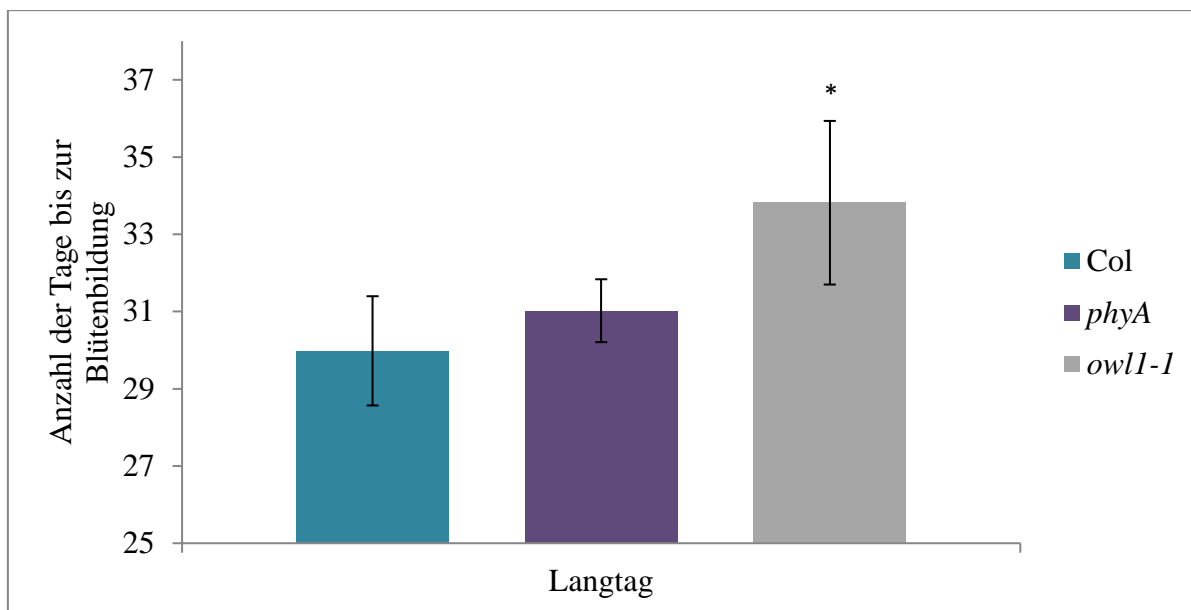
**Abbildung 6:** Hypokotyllänge nach dreitägiger Bestrahlung mit kontinuierlichem Dunkelrotlicht (FR c 1,2  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) oder kontinuierlichem Rotlicht (R c 1,0  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Angegeben ist die Hypokotyllänge in % zur Hypokotyllänge von im Dunkeln gezogenen Keimlingen. Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. Die mit einem Stern (\*) markierten Säulen zeigen einen signifikanten Unterschied im Vergleich zum Wildtyp (Col).

In diesem Experiment zeigte *phyA* unter konstantem Dunkelrotlicht ein längeres Hypokotyl als Col, unter konstantem Rotlicht ein kürzeres Hypokotyl als Col. Das bestätigt, dass *phyA* sowohl in die HIR als auch in die LFR involviert ist. Unter beiden Bedingungen konnte weder für *owl1-1* noch für *OWL1-OE* ein signifikanter Effekt nachgewiesen werden, *OWL1* ist weder an der HIR noch an der LFR beteiligt.

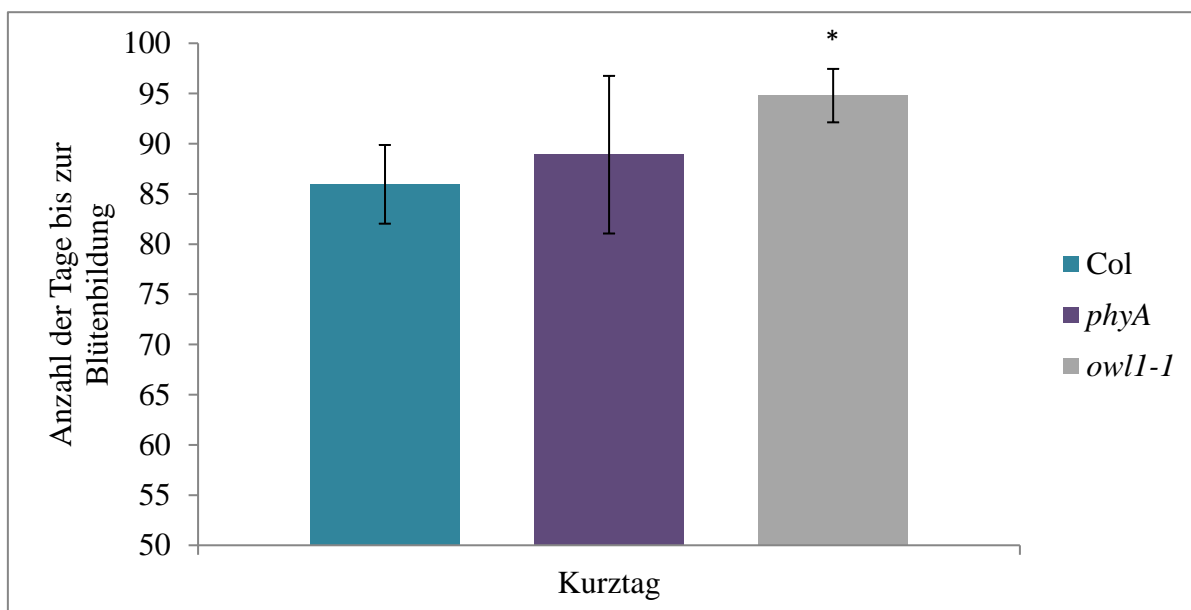
### 3.1.3.3 Zeitspanne bis zur Induktion der Blüte

Bei der Langtagpflanze *A. thaliana* wird die Blüte durch Überschreitung einer kritischen Tageslänge induziert und über die Lichtrezeptoren *phyA*, *phyB* und verschiedene Cryptochrome gesteuert. *PhyA* fördert die Blühinduktion, *PhyB* und Cryptochrome hemmen sie. Daher zeigen *phyA* Mutanten eine verzögerte Blühinduktion, *phyB* und *cry* Mutanten eine verfrühte (El-Din El-Assal et al. 2003).

Im folgenden Experiment wurden unterschiedliche Linien unter Langtagbedingungen (16 h WL/ Tag) und unter Kurztagbedingungen (8 h WL/ Tag) bis zum Erscheinen der Infloreszenz angezogen und der Zeitpunkt der Blüte verglichen (siehe Abbildung 7 und Abbildung 8). So konnte die Funktion von *OWL1* in der adulten Pflanze untersucht werden.



**Abbildung 7:** Bestimmung des Zeitpunkts der Blühinduktion. Pflanzen wurden bis zum Erscheinen der Infloreszenz unter Langtagbedingungen (16 h Licht/ Tag) auf Erde kultiviert. Durch die Fehlerbalken wird die Standardabweichung angegeben. Die mit einem Stern (\*) markierten Säulen zeigen einen signifikanten Unterschied im Vergleich zum Wildtyp (Col).



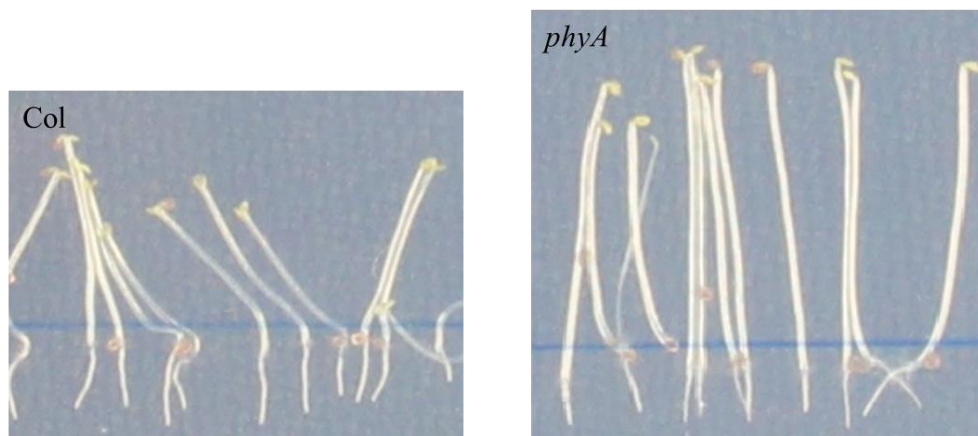
**Abbildung 8:** Bestimmung des Zeitpunkts der Blühinduktion. Pflanzen wurden bis zum Erscheinen der Infloreszenz unter Kurztagbedingungen (8 h Licht/ Tag) auf Erde kultiviert. Durch die Fehlerbalken wird die Standardabweichung angegeben. Die mit einem Stern (\*) markierten Säulen zeigen einen signifikanten Unterschied im Vergleich zum Wildtyp (Col).

Sowohl unter Kurztag- als auch unter Langtagbedingungen zeigte *owl1-1* einen signifikant verzögerten Zeitpunkt der Blühinduktion im Vergleich zum Wildtyp. Im Vergleich mit *phyA*

konnte für *owl1-1* kein signifikanter Effekt nachgewiesen werden. OWL1 besitzt also auch eine Funktion in der adulten Pflanze. Da sich unter beiden Versuchsbedingungen die gleiche Tendenz zeigt, scheint zirkadiane Rhythmik keine Rolle zu spielen. Für eine bessere Einschätzung der Ergebnisse ist eine Wiederholung dieses Experimentes mit zusätzlicher Verwendung der *OWL1-OE* notwendig.

#### 3.1.3.4 Agravitropisches Wachstum unter Dunkelrotlicht

Unter Einfluss von rotem und dunkelrotem Licht verlieren Keimlinge die Fähigkeit, senkrecht zur Schwerkraft zu wachsen. Sie beginnen, sich zufällig zu orientieren und führen dabei eine Schwingungsbewegung aus. Da *phyA*-Keimlingen der Dunkelrotlichtrezeptor fehlt, wachsen diese unter dunkelroten Lichtbedingungen weiterhin senkrecht zur Gravitationsquelle (Poppe et al. 1996, Robson et al. 1996) (siehe Abbildung 9). Dieser Effekt wird über die VLFR vermittelt.



**Abbildung 9:** Hypokotylwachstum von Col und *phyA* unter Dunkelrotlichtpulsen. Die Keimlinge wurden für drei Tage auf vertikalen Platten unter Dunkelrotlichtpulsen ( $FR_p$   $0,4 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) angezogen und der Winkel zwischen Vertikaler und Hypokotyl vermessen.

Im dargestellten Experiment (Tabelle 12) wurden die Wachstumswinkel der Hypokotyle der Linien *phyA*, *owl1-1*, *OWL1-OE* und der Komplementationslinien *OWL1/owl1* und *OWL1-QPD/owl1* bei Kultivierung unter Einfluss von Dunkelrotlichtpulsen mit dem Wildtyp verglichen. Die Keimlinge wurden für drei Tage auf vertikalen Platten unter Dunkelrotlichtpulsen ( $0,4 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) angezogen und der Winkel zwischen Vertikaler und Hypokotyl vermessen. Anschließend wurden die Varianzen berechnet (siehe 2.2.5.3) und miteinander verglichen.

**Tabelle 12:** Vergleich der Varianzen durch Verwendung des F-Tests. Werte größer 1,0 stellen signifikante Unterschiede dar. Die Farben stellen die unterschiedlich starken Effekte dar, grün (schwach), gelb (stärker), lila (stark), blau (am auffälligsten).

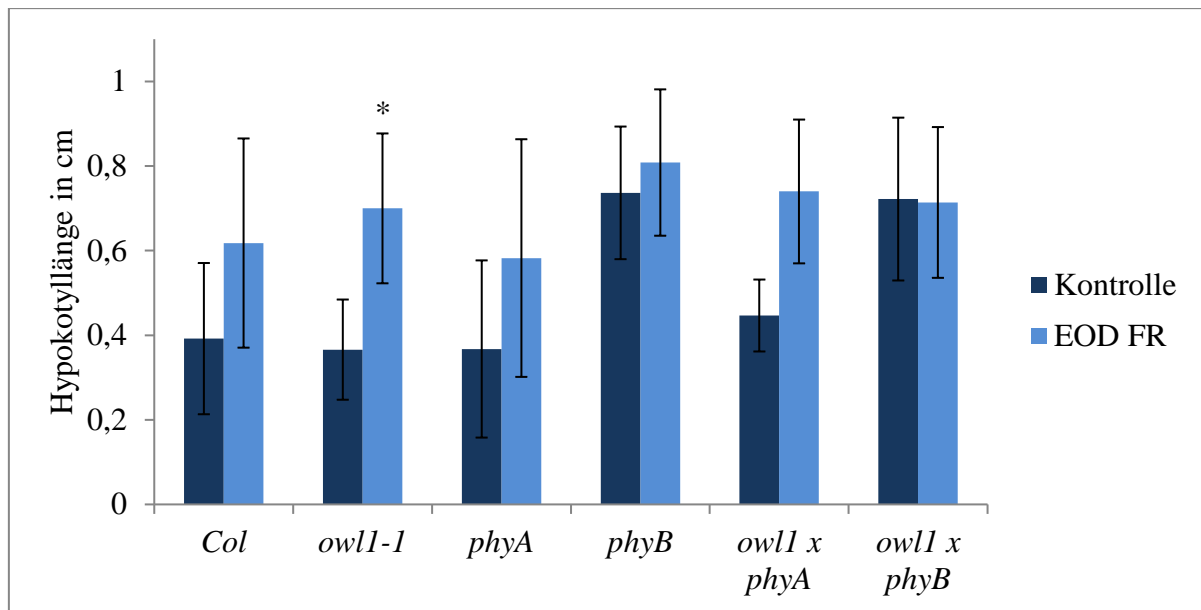
	Col	<i>phyA</i>	<i>owl1-1</i>	<i>OWL1/owl1</i>	<i>OWL1-QPD/owl1</i>	<i>OWL1-OE</i>
Col		4,5	2,4	1,2	1,8	2,1
<i>phyA</i>			1,9	3,9	2,5	2,2
<i>owl1-1</i>				2,0	1,3	1,1
<i>OWL1/owl1</i>					1,6	1,8
<i>OWL1-QPD/owl1</i>						1,1
<i>OWL1-OE</i>						

Ein signifikanter Effekt konnte für alle Linien nachgewiesen werden. Dieser war jedoch unterschiedlich stark ausgeprägt. Wie erwartet, zeigte *phyA* einen besonders starken Effekt im Vergleich zu Col, *phyA* Keimlinge wachsen senkrecht zur Gravitationsquelle. Auch *owl1-1* unterschied sich deutlich vom Wildtyp, wie auch von Kneissl und Kollegen gezeigt (Kneissl et al. 2009). Die Komplementationslinie *OWL1/owl1* verhielt sich ähnlich dem Wildtyp, sie führte deutliche Schwingungsbewegungen aus, was eine erfolgreiche Komplementation bestätigt. Die Komplementationslinie mit mutiertem OWL1-QPD in *owl1* *OWL1-QPD/owl1* unterschied sich stärker vom Wildtyp als die normale Komplementation - das mutierte OWL1 schien somit nicht vollständig in der Lage zu sein, die Mutante *owl1* zu komplementieren. Die Überexpressionslinie *OWL1-OE* zeigte keinen einheitlichen auffälligen Effekt.

### 3.1.3.5 Hypokotylelongation durch die EOD FR Antwort

Der hohe Anteil an Dunkelrotlicht im Licht der Dämmerung führt dazu, dass *phyB* in der Pflanze inaktiviert wird (Casal 2012). So können Transkriptionsfaktoren akkumulieren, welche das Wachstum in der Nacht fördern. Um zu untersuchen, ob die VLFR mit dieser „end-of-day far-red“ (EOD FR) Antwort in Verbindung steht, wurde mit den Linien *owl1-1*, *phyA*, *phyB* und den Doppelmutanten *owl1* x *phyA* und *owl1* x *phyB* folgendes Experiment durchgeführt:

Die Keimlinge wurden nach 12 h Weißlicht einem 30-minütigen Dunkelrotlichtpuls ausgesetzt und anschließend über Nacht im Dunkeln inkubiert. Nach 7 Tagen unter diesen Bedingungen wurde die Länge der Hypokotyle mit Keimlingen verglichen, die für 7 Tage jeweils 12 h im Weißlicht und direkt anschließend 12 h im Dunkeln kultiviert wurden (Abbildung 10).

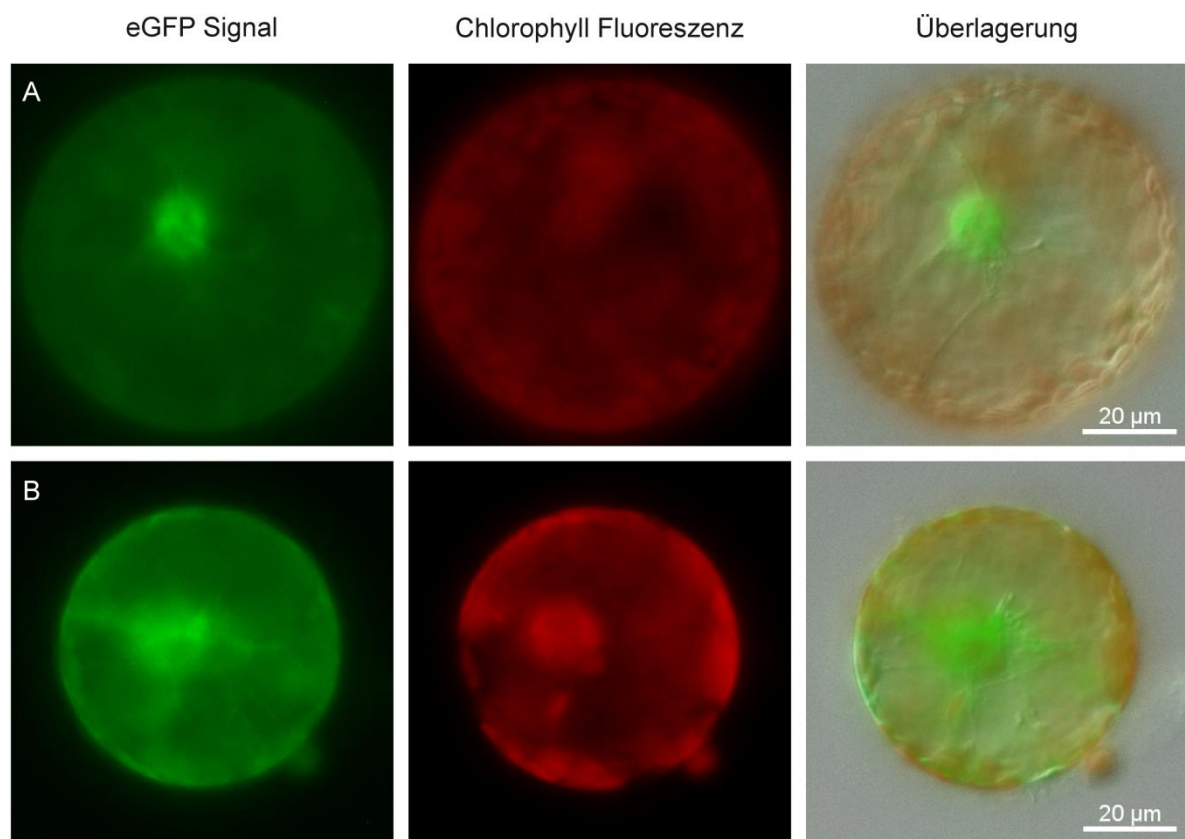


**Abbildung 10:** Bestimmung des Einflusses eines EOD FR Pulses auf das Wachstum. Pflanzen wurden für 7 Tage entweder unter Kontrollbedingungen angezogen (12 h Weißlicht/ Tag) oder sie wurden vor der Dunkelheit einem 30-minütigen Dunkelrotlichtpuls ausgesetzt (EOD FR). Der Vergleich der Hypokotyllängen der EOD FR Pflanzen mit den Kontrollpflanzen wurde graphisch dargestellt. Durch die Fehlerbalken wird die Standardabweichung angegeben. Die mit einem Stern (\*) markierten Säulen zeigen einen signifikanten Unterschied im Vergleich zum Wildtyp (*Col*).

*Owl1-1* zeigte ein signifikant verlängertes Hypokotyl unter EOD FR Bedingungen im Verhältnis zur Kontrolle verglichen mit Wildtyp. Dies lässt darauf schließen, dass die VLFR mit der EOD FR Antwort in Verbindung stehen. *PhyB* weist sowohl unter Kontroll- als auch unter EOD FR Bedingungen ein verlängertes Hypokotyl auf. Da die Doppelmutante *owl1 x phyB* keinen additiven Phänotyp zeigt, wirken OWL1 und PHYB nicht unabhängig voneinander. Möglicherweise reguliert OWL1 *phyB* oder stabilisiert die aktive Form von *phyB*.

### 3.2 Subzelluläre Lokalisation von OWL1 und OWL1-QPD mittels Fluoreszenzmikroskopie

Zur *in vivo* Lokalisierung wurden *OWL1* und *OWL1 QPD* in Vektoren für N- und C-terminale GFP-Fusionen (pb7WGF2, pk7FWG2) kloniert. Diese Konstrukte wurden in das Agrobakterium *A. tumefaciens* transformiert, um anschließend das Fusionsprotein in Blattmesophyllzellen von *Nicotiana benthamiana* transient exprimieren zu können. Aus dem Pflanzenmaterial wurden Protoplasten extrahiert und anhand des Fluoreszenzsignals die Lokalisierung des Proteins in der Zelle bestimmt (Abbildung 11).



**Abbildung 11:** Subzelluläre Lokalisation von OWL1. (A) Fluoreszenzanalyse von OWL1-GFP in transformierten Protoplasten. (B) Fluoreszenzanalyse von OWL1 QPD-GFP in transformierten Protoplasten. Erste Spalte: eGFP Fluoreszenz des Fusionsproteins. Zweite Spalte: Fluoreszenz von Chlorophyll. Dritte Spalte: Überlagerung der Fluoreszenzsignale mit der „differential interference contrast“ (DIC) Aufnahme.

Wie in Abbildung 11A zu erkennen ist, konnte das Fusionsprotein OWL1-GFP sowohl im Zytosol als auch im Nukleus nachgewiesen werden. Somit konnte die zuvor gezeigte Lokalisation von OWL1 bestätigt werden (Kneissl et al. 2009). Auch OWL1 QPD-GFP (siehe Abbildung 11B) zeigte eine Lokalisation in Zytosol und Nukleus. Zwischen der

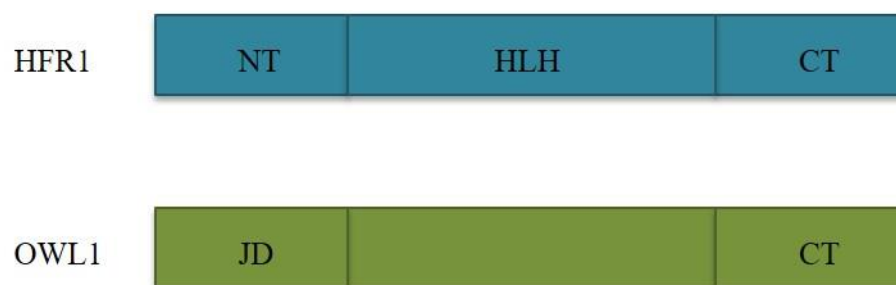
N-terminalen und der C-terminalen GFP-Fusion ließ sich kein Unterschied feststellen (nicht gezeigte Daten).

### 3.3 Identifikation möglicher OWL1 Interaktionsproteine

Basierend auf einem Hefe-Zwei-Hybrid Screen, bei dem OWL1 gegen eine cDNA-Bank getestet wurde, wurden im Rahmen dieser Arbeit einige potentielle Interaktionspartner erneut getestet und bei positivem Ergebnis anschließend genauer analysiert.

#### 3.3.1 Bestätigung der Interaktion mittels Hefe-Zwei-Hybrid-System

Die OWL1 kodierende Sequenz wurde durch Klonierung in den Vektor pDEST32 mit einer DNA-Bindedomäne (GAL-DB) fusioniert. Zusätzlich zum Volllängeprotein wurden auch die kodierenden Sequenzen von OWL1 ohne C-Terminus (OWL1 $\Delta$ CT) und OWL1 ohne J-Domäne (OWL1 $\Delta$ JD) in pDest32 kloniert (siehe Abbildung 12). Die kodierenden Sequenzen der möglichen Interaktionspartner HFR1, HSP81, PRMT4a und WAV2 wurden in Volllänge in pDEST22 mit einer Aktivierungsdomäne (GAL-AD) fusioniert. Der Interaktor HFR1 ist ein positiver Regulator der phyA-vermittelten HIR. HSP81 gehört zur Familie der HSP90 Proteine und wird zur ATP- und Proteinbindung benötigt. PRMT4A ist eine Protein Arginin Methyltransferase. WAV2 ist ein BEM46-like Protein und ist in metabolische Prozesse und Wurzelwachstum involviert. HFR1 wurde zusätzlich als HFR1 $\Delta$ NT, HFR1 $\Delta$ CT und HFR1 $\Delta$ NT,  $\Delta$ HLH in pDest22 kloniert (Nukleotidangaben der Domänen von OWL1 und HFR1 siehe Tabelle 10).

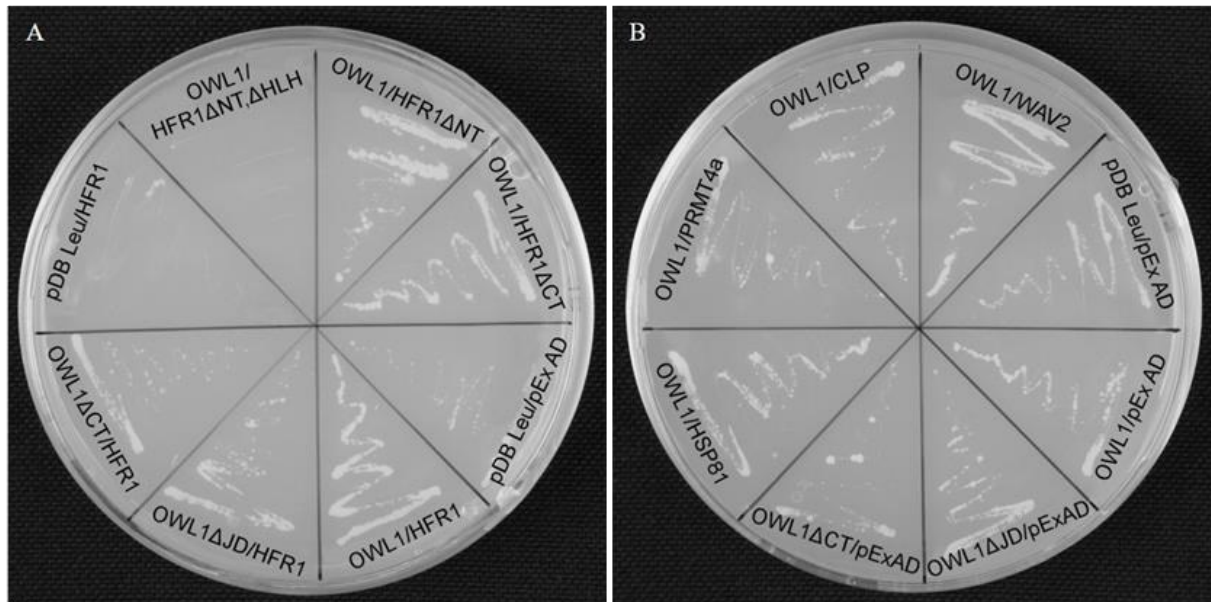


**Abbildung 12:** Darstellung der Domänen von HFR1 (N-Terminus (NT), Helix-Loop-Helix (HLH) und C-Terminus (CT)) und OWL1 (J-Domäne (JD) und C-Terminus (CT)).

Jeweils zwei Konstrukte, OWL1-DB und Interaktor-AD wurden in kompetente Hefezellen transformiert und die Kolonien auf Mangelmedium angezogen (siehe Abbildung 13). Bei



einer Interaktion wird die Histidin-Auxotrophie des Hefestammes Mav203 durch Expression des HIS3-Gens komplementiert. Da der *his*-Phänotyp dieses Stammes jedoch nicht sehr ausgeprägt ist, wurde zusätzlich der Histidinsynthese-Inhibitor 3AT (10mM) verwendet, um das Hintergrundwachstum zu verringern.



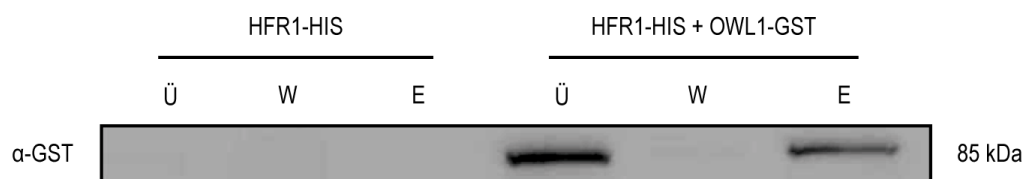
**Abbildung 13:** Hefe-Zwei-Hybrid Test zur Überprüfung der Interaktion von OWL1, OWL1ΔJD, OWL1ΔCT mit den potentiellen Interaktoren HFR1, HFR1ΔNT, HFR1ΔCT, HFR1ΔNT ΔHLH (A), HSP81, PRMT4a, CLP und WAV2 (B). Die leeren Vektoren pDBLeu und pExAD dienten als Test auf Autoaktivierung der Proteine. Die kotransformierten Hefezellen wurden auf SC-Leu-Trp-His Medium +10mM 3AT kultiviert.

Wie in Abbildung 13A zu erkennen ist, konnte die Interaktion von OWL1 mit HFR1 bestätigt werden. Für OWL1 mit fehlender J-Domäne konnte eine schwächere Interaktion mit HFR1 gezeigt werden, bei OWL1 mit fehlendem C-Terminus zusammen mit HFR1 kam es kaum zu Wachstum. Der Test auf Autoaktivierung von HFR1 (pDBLeu/HFR1) ergab ein negatives Ergebnis. HFR1ΔNTΔHLH war es nicht möglich, mit OWL1 zu interagieren. Fehlte HFR1 nur der N-Terminus, war eine schwächere Interaktion als mit dem Volllänge-Protein festzustellen; für HFR1 ohne C-Terminus in Koexpression mit OWL1 konnte starkes Wachstum der Hefen nachgewiesen werden. Das weist darauf hin, dass OWL1 den C-Terminus benötigt, um mit HFR1 zu interagieren, HFR1 den N-Terminus und die HLH-Domäne. Bei der Negativkontrolle pDBLeu/pExAD konnte kein Wachstum festgestellt werden. In Abbildung 13B ist zu erkennen, dass OWL1 und OWL1ΔJD eine schwache Fähigkeit zur Autoaktivierung besitzen. Bei OWL1ΔCT/pExAD konnte kein Wachstum nachgewiesen werden. Die Koexpression von HSP81 bzw. WAV2 und OWL1 führte zu stärkerem Wachstum als im Kontrollansatz OWL1/pExAD, was auf eine Interaktion der

Proteine schließen lässt. Hingegen schienen PRMT4a und CLP nicht mit OWL1 zu interagieren, da hier das Wachstum verglichen mit den Kontrollen nicht promoviert war.

### 3.3.2 Bestätigung der Interaktion zwischen OWL1 und HFR1 mittels „Pull-Down-Assay“

Um die durch das Hefe-Zwei-Hybrid System gefundenen Interaktionen zu bestätigen, wurde ein „Pull-Down-Assay“ durchgeführt. Die Proteine HFR1-HIS und OWL1-GST wurden hierfür in *E. coli* überexprimiert, isoliert und anschließend wurde ein „Pull-Down-Assay“ über Bindung an Ni-NTA-Agarose durchgeführt. Zur Kontrolle wurde zuerst nur HFR1-HIS verwendet, anschließend wurden HFR1-HIS und OWL1-GST gemeinsam inkubiert und auf die Säule aufgetragen. Die verschiedenen Fraktionen wurden per SDS-PAGE und anschließender Western Blot Analyse untersucht. Das Ergebnis beider Ansätze ist in Abbildung 14 dargestellt.



**Abbildung 14:** Western Blot Analyse des „Pull-Down-Assays“ der Kontrolle HFR1-HIS und von HFR1-HIS mit OWL1-GST. Die Immunodetektion von OWL1-GST erfolgte mit einem anti-GST Antikörper. Ü – Überstand, W – Wasch, E - Elution

Wie in Abbildung 14 zu sehen ist, kann in keiner der Fraktionen der Kontrolle ein Signal bei der für das Fusionskonstrukt OWL1-GST zu erwartenden Größe mittels  $\alpha$ -GST Antikörper detektiert werden. Im Gegensatz dazu ist ein deutliches Signal auf der mit OWL1-GST korrespondierenden Position auf der Membran im Überstand der Probe mit HFR1-HIS und OWL1-GST detektierbar. Die Tatsache, dass ebenfalls in der Elution ein vergleichbares Signal nachgewiesen werden kann, zeigt, dass OWL1-GST an der Ni-NTA retiniert wird, obwohl es die Nickelionen nicht direkt selbst binden kann. Dementsprechend muss das an die Säule bindende HFR1-HIS der Grund für die Retention von OWL1-GST sein. Da das Fusionskonstrukt nicht in der Waschfraktion detektiert wurde, konnte ausgeschlossen werden, dass das Auftreten des Proteins in der Elution durch Überladung der Säule oder mangelhafte Stringenz der Waschbedingungen hervorgerufen wurde.

### 3.3.3 Bestätigung der Interaktionen mittels „Crosslinking“

Um in *A. thaliana in vivo* die Interaktionen von OWL1 und OWL1-QPD genauer zu untersuchen, wurden die Proteine in 2 Wochen altem Pflanzenmaterial von *OWL1-OE-GFP* und *OWL1-QPD-GFP/Col* Linien mithilfe des 12 Å-Crosslinkreagenz DSP (Dithiobis(succinimidylpropionat)) kovalent miteinander verbunden. Anschließend wurden die Extrakte unter Verwendung von GFP-Trap A aufgereinigt, durch SDS-Page aufgetrennt, oberhalb einer Größe von 86 kDa (59 kDa OWL1+ 27 kDa GFP) aus dem Gel ausgeschnitten und mittels Massenspektrometrie analysiert (siehe Tabelle 13).

**Tabelle 13:** Über Massenspektrometrie identifizierte putative OWL1-Interaktionspartner nach Bereinigung. TF=Transkriptionsfaktor, HSP=Heat Shock Protein, HPD: OWL1 mit unveränderter J-Domäne, QPD: OWL1 mit Mutation im aktiven Zentrum der J-Domäne

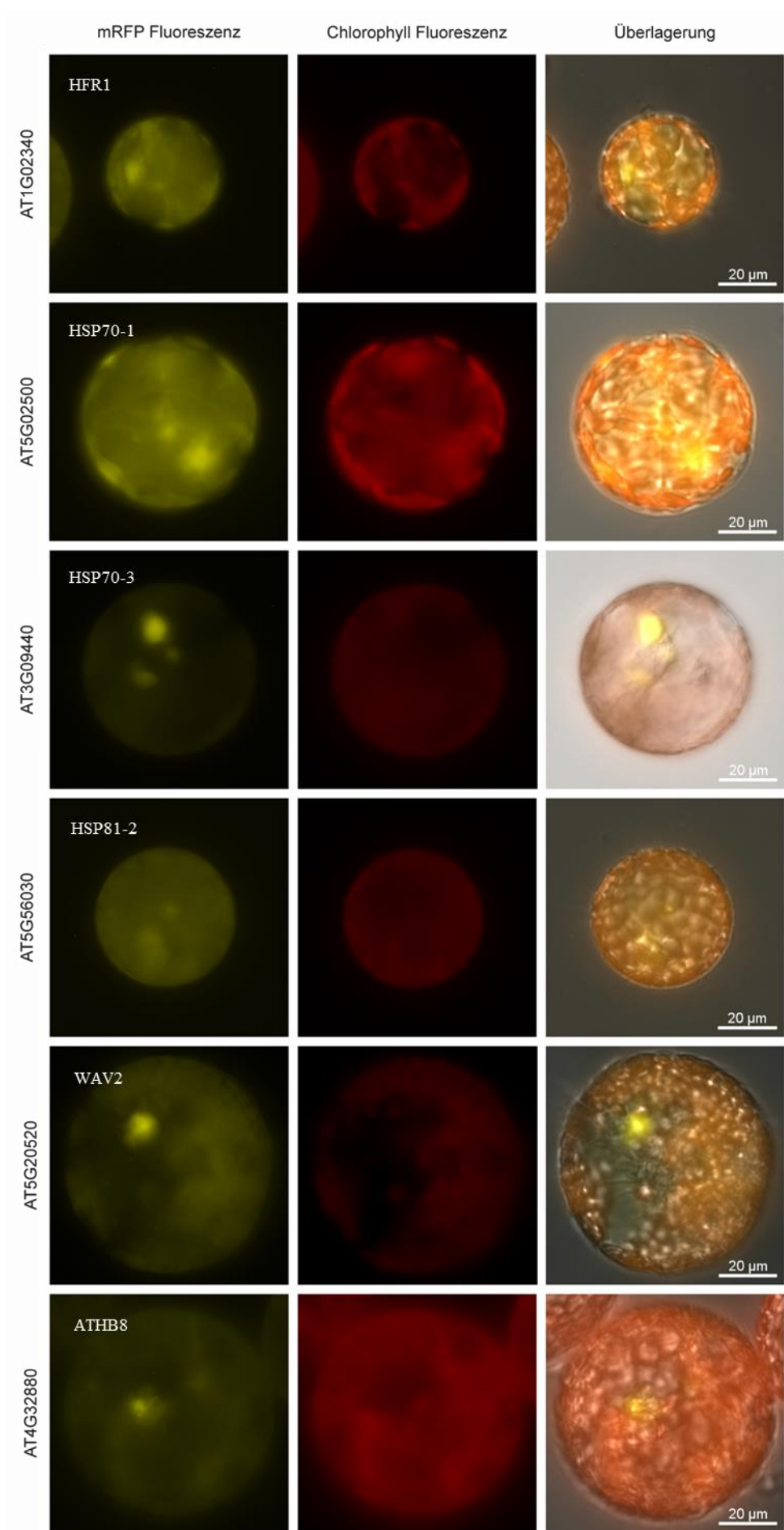
Locus	Name	Häufigkeit bei HPD (Anzahl bei 4 Wiederholungen)	Häufigkeit bei QPD (Anzahl bei 2 Wiederholungen)	Funktion	Vorhergesagte Lokalisation
AT2G38300	Myb-like HTH transcriptional regulator family protein (MYB-LIKE)	2	1	TF	Nukleus/ Zytoplasma
AT3G04590	At hook motif DNA-binding family protein (AHL14)	1	2	TF	Nukleus/ Zytoplasma
AT5G02500.2	Heat shock cognate protein 70-1 (HSP70-1)	4	2	HSP	Nukleus/ Zytosol
AT3G09440	Heat shock protein 70 family protein (HSP70-3)	2	0	HSP	Zytosol/ Zytoplasma
AT4G32880	Homeobox gene 8 (ATHB8)	1	1	TF	Nukleus/ Zytoplasma
AT2G20180	Phytochrome interacting factor 3-like 5 (PIF1)	1	0	TF	Nukleus/ Zytoplasma
AT1G80730	Zinc-finger protein 1 (ZFP1)	2	1	TF	Nukleus/ Zytoplasma

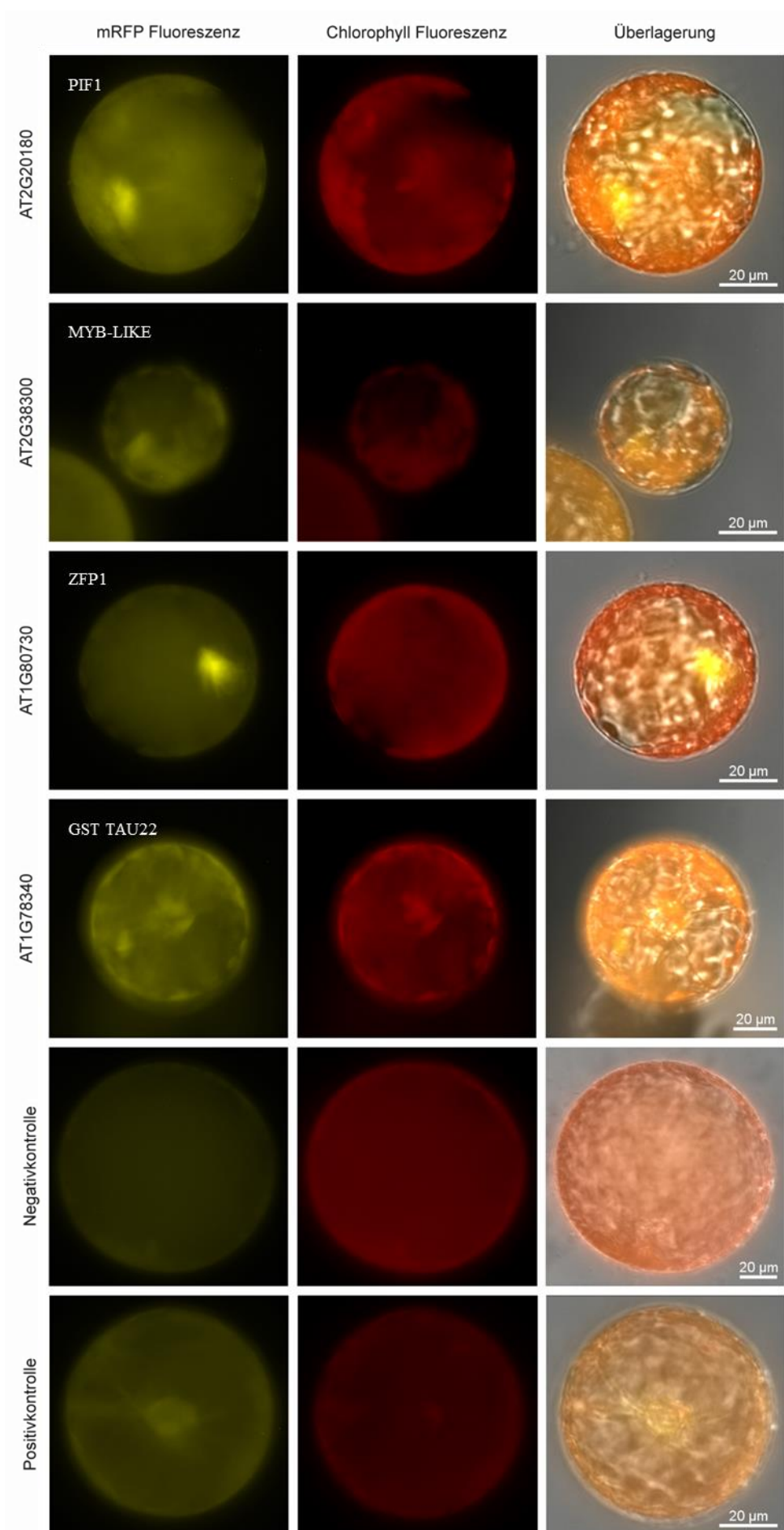
AT1G78340	Glutathione S-transferase TAU22 (GST TAU22)	4	1		Nukleus/ Zytoplasma
-----------	---	---	---	--	------------------------

Die durch „Crosslinking“ und anschließende Massenspektrometrie identifizierten putativen Interaktoren von OWL1 sind Tabelle 13 zu entnehmen. Nach der Bereinigung gegen die Kontrolle, für die Wildtyp-Extrakt unter Zugabe von Crosslinker verwendet wurde, und die vorhergesagte Lokalisation wurden die am häufigsten gefundenen Proteine für weitere Versuche ausgewählt. Diese waren die Hitze-Schock-Proteine HSP70-1, HSP70-3, die Transkriptionsfaktoren MYB-LIKE, AHL14, ATHB8, PIF1, ZFP1 und die Glutathion Transferase GST TAU22. Auffällig ist hier, dass es sich bei den gefundenen Proteinen hauptsächlich um HSPs und Transkriptionsfaktoren handelt.

### 3.3.4 Lokalisierung der Interaktion mittels bimolekularer Fluoreszenzkomplementation

Um die Interaktion von OWL1 und dem jeweiligen Interaktionspartner lokalisieren zu können, wurde ein „BiFC Assay“ durchgeführt. Die Zielgene *OWL1*, *HFR1*, *HSP70-1*, *HSP70-3*, *HSP81-2*, *WAV2*, *ATHB8*, *PIF1*, *MYB-LIKE*, *ZFP1* und *GST TAU22* wurden in die Zielvektoren pBiFC 3 BamHI CP SalI mRFPN und pBiFC 4 BamHI CP SalI mRFPC (Zilian et al. 2011) kloniert. Diese Konstrukte, welche entweder für den N-terminalen Bereich des rot fluoreszierenden Proteins RFP, RFPN oder den C-terminalen Teil des Proteins, RFPC kodierten, wurden in Agrobakterien transformiert. Durch die Transformation von *N. benthamiana* Blättern durch Infiltration mit Agrobakterien wurde transiente Ko-Expression von getagten putativen Interaktionspartnern erreicht. Nach erfolgreicher Expression wurden aus den transformierten Blättern Protoplasten isoliert. Bei einer Interaktion der beiden testenden Fusionsproteine kam es zu einer Rekonstitution des fluoreszierenden RFPs aus dem N- und C-terminalen Fragment, was mithilfe von Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen werden konnte (siehe Abbildung 15).





**Abbildung 15:** Fluoreszenzanalyse von *N. benthamiana* Protoplasten, die OWL1 und den jeweiligen Interaktionspartner ko-exprimieren. Erste Spalte: RFP Fluoreszenz durch Interaktion der beiden Fusionsproteine. Zweite Spalte: Fluoreszenz von Chlorophyll. Dritte Spalte: Überlagerung der Fluoreszenzsignale mit der „differential interference contrast“ (DIC) Aufnahme.

In Abbildung 15 wurde die Interaktion von OWL1 mit HFR1 (AT1G02340), HSP70-1 (AT5G02500), HSP70-3 (AT3G09440), HSP81-2 (AT5G56030), WAV2 (AT5G20520), ATHB8 (AT4G32880), PIF1 (AT2G20180), MYB-LIKE (AT2G38300), ZFP1 (AT1G80730) und GST TAU22 (AT1G78340) untersucht und mit einer Negativ- und einer Positivkontrolle verglichen. Als Negativkontrolle dienten die leeren Vektoren, als Positivkontrolle wurde ein Hüllprotein eines pflanzlichen Pockenvirus verwendet, welches im Hefe-Zwei-Hybrid System die Fähigkeit zur Selbstaktivierung zeigte (Zilian et al. 2011). Es konnte Interaktion von OWL1 mit allen Proteinen nachgewiesen werden. Ein besonders starkes Signal zeigte sich bei HFR1, HSP70-1, HSP70-3, WAV2, PIF1 und ZFP1. Zur genaueren Lokalisation müssten jedoch weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

### 3.4 Charakterisierung der Interaktionspartner

#### 3.4.1 Phänotypische Charakterisierung der Mutanten

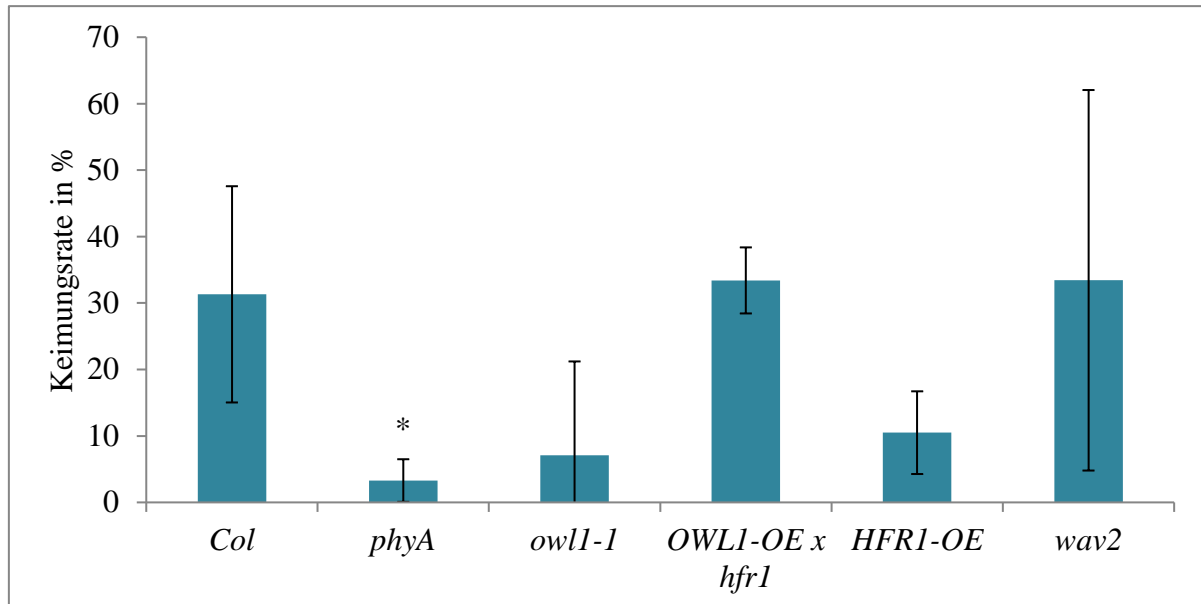
Um Erkenntnisse über den Effekt zu gewinnen, den die Interaktion von HFR1 und OWL1 auf den Phänotyp der Pflanze hat, wurden durch Kreuzungen zwischen den Mutanten *owl1-1* bzw. *OWL1-OE* und *hfr1* bzw. *HFR1-OE* Doppelmутanten erzeugt. Außerdem konnten mit verschiedenen anderen Linien der putativen Interaktoren Experimente zum Phänotyp durchgeführt werden. Es wurden die Keimungsrate unter verschiedenen Lichtbedingungen, die Inhibierung der Hypokotylelongation unter verschiedenen Lichtbedingungen, die Zeitspanne bis zur Induktion der Blüte und das agravitropische Wachstum unter Dunkelrotlicht untersucht. Um die Rolle der verschiedenen Proteine in der Lichtsignaltransduktion einordnen zu können, wurde die VLFR und die HIR getestet.

##### 3.4.1.1 Keimungsrate unter verschiedenen Lichtbedingungen

Die Samen für das Experiment aus Abbildung 16 und Abbildung 17 wurden befeuchtet und anschließend 30 min mit Dunkelrotlicht bestrahlt, um vorhandenes Phytochrom zu inaktivieren. Die Samen wurden für die folgenden 48 h im Dunkeln inkubiert und daraufhin erneut 30 min mit Dunkelrotlicht bestrahlt, um das im Dunkeln gebildete phyA zu aktivieren.



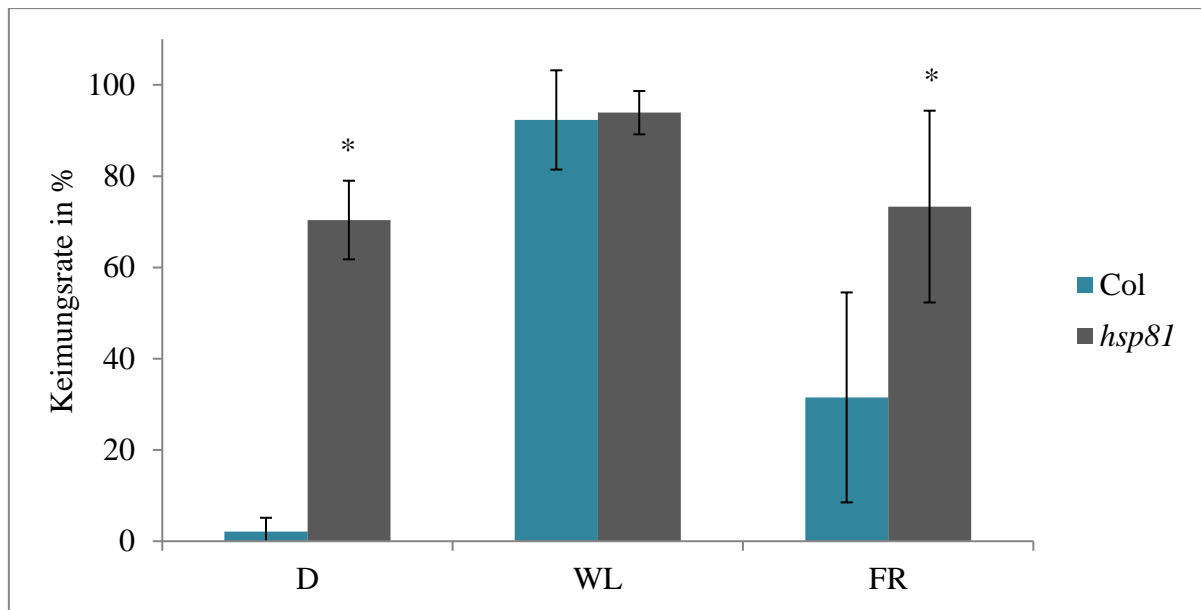
So wurde die VLFR angeregt und die Keimung initiiert. Nach weiteren 72 h im Dunkeln wurde die Keimungsrate bestimmt und mit der Dunkelkeimungsrate und der Gesamtkeimungsrate im Weißlicht verglichen.



**Abbildung 16:** Keimungsrate von *owl1-1*, *OWL1-OE x hfr1*, *HFR1-OE* und *wav2*. Samen wurden direkt nach dem Auslegen mit Dunkelrotlicht bestrahlt. Anschließend wurden sie 48 h im Dunkeln aufbewahrt und einem erneuten Dunkelrotlichtpuls ausgesetzt. Diese Keimungsrate wurde in Abhängigkeit von der Dunkelkeimungsrate und der Gesamtkeimungsrate im Weißlicht dargestellt. Durch die Fehlerbalken wird die Standardabweichung angegeben. Die mit einem Stern (\*) markierten Säulen zeigen einen signifikanten Unterschied im Vergleich zum Wildtyp (Col).

In diesem Experiment konnte unter Dunkelrotlicht für *phyA* eine verringerte Keimung im Vergleich zum Wildtyp festgestellt werden (siehe Abbildung 16). Für *phyA* war bereits bekannt, dass es eine Rolle bei der VLFR spielt. *Owl1-1*, *OWL1-OE x hfr1*, *HFR1-OE* und *wav2* zeigten keinen signifikanten Effekt. In zukünftigen Experimenten sollte noch zusätzlich die Keimungsrate von *hfr1* und *OWL1-OE* untersucht werden.



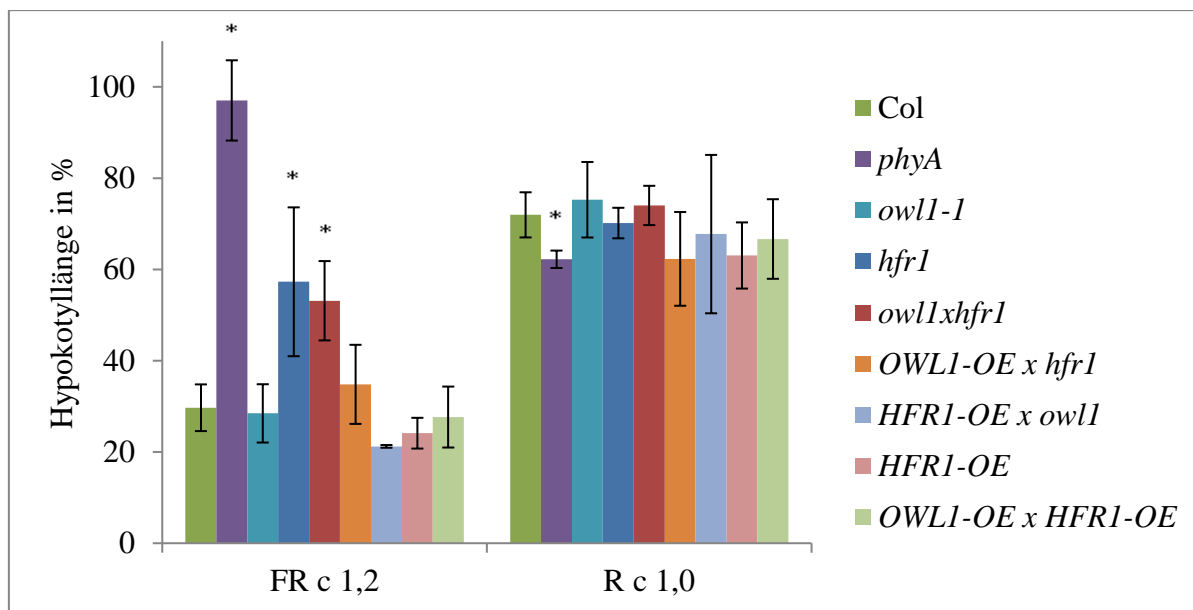


**Abbildung 17:** Keimungsrate von *hsp81*. Samen wurden direkt nach dem Auslegen mit Dunkelrotlicht bestrahlt. Anschließend wurden sie im Dunkeln aufbewahrt (D), Weißlicht ausgesetzt (WL) oder nach 48 h einem erneuten Dunkelrotlichtpuls ausgesetzt (FR). Durch die Fehlerbalken wird die Standardabweichung angegeben. Die mit einem Stern (\*) markierten Säulen zeigen einen signifikanten Unterschied im Vergleich zum Wildtyp (Col).

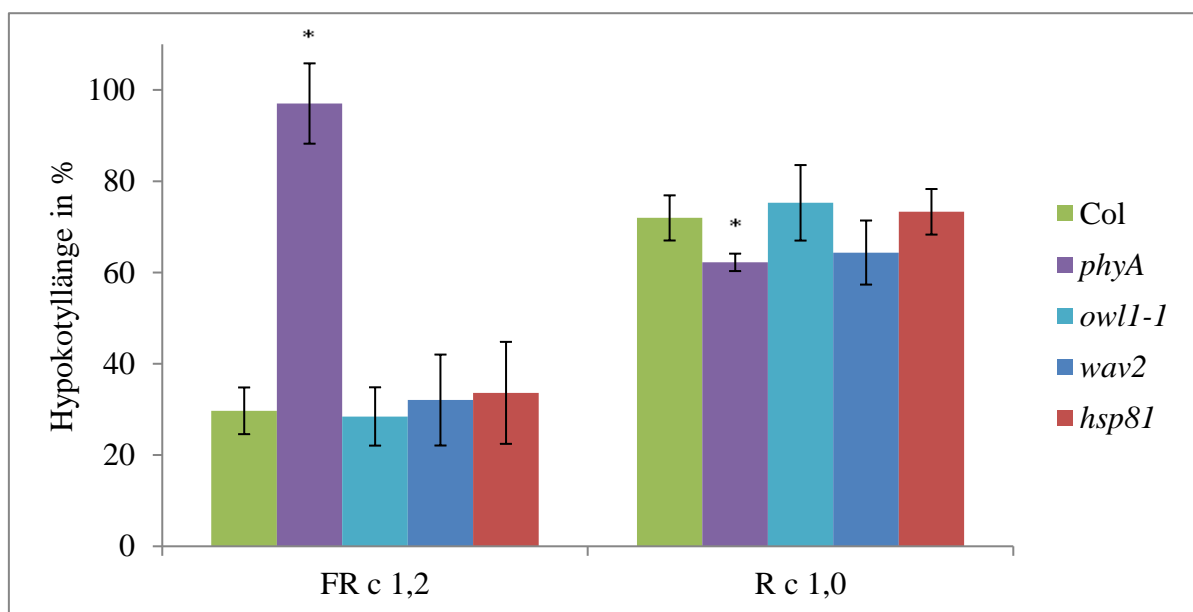
Die Mutante *hsp81* keimte signifikant besser und wies eine erhöhte Dunkelkeimung auf. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass HSP81 eine hemmende Wirkung bei der Keimung ausübt.

#### 3.4.1.2 Inhibierung der Hypokotylelongation

Um den Effekt der Mutationen auf die verschiedenen Signalwege zu untersuchen, wurden Keimlinge der verschiedenen Linien für drei Tage unter konstantem Rotlicht (LFR), konstantem Dunkelrotlicht (HIR) und Pulsen von Dunkelrotlicht (VLFR, nicht gezeigte Daten, da Wiederholungen nötig) angezogen. Diese Keimlinge wurden anschließend bezüglich der Länge mit Keimlingen, die im Dunkeln kultiviert wurden, verglichen (siehe Abbildung 18 und Abbildung 19).



**Abbildung 18:** Hypokotyllänge verschiedener Mutantenlinien nach dreitägiger Bestrahlung mit kontinuierlichem Dunkelrotlicht (FR c 1,2  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) oder kontinuierlichem Rotlicht (R c 1,0  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Angegeben ist die Hypokotyllänge in % zur Hypokotyllänge von im Dunkeln kultivierten Keimlingen. Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. Die mit einem Stern (\*) markierten Säulen zeigen einen signifikanten Unterschied im Vergleich zum Wildtyp (Col).

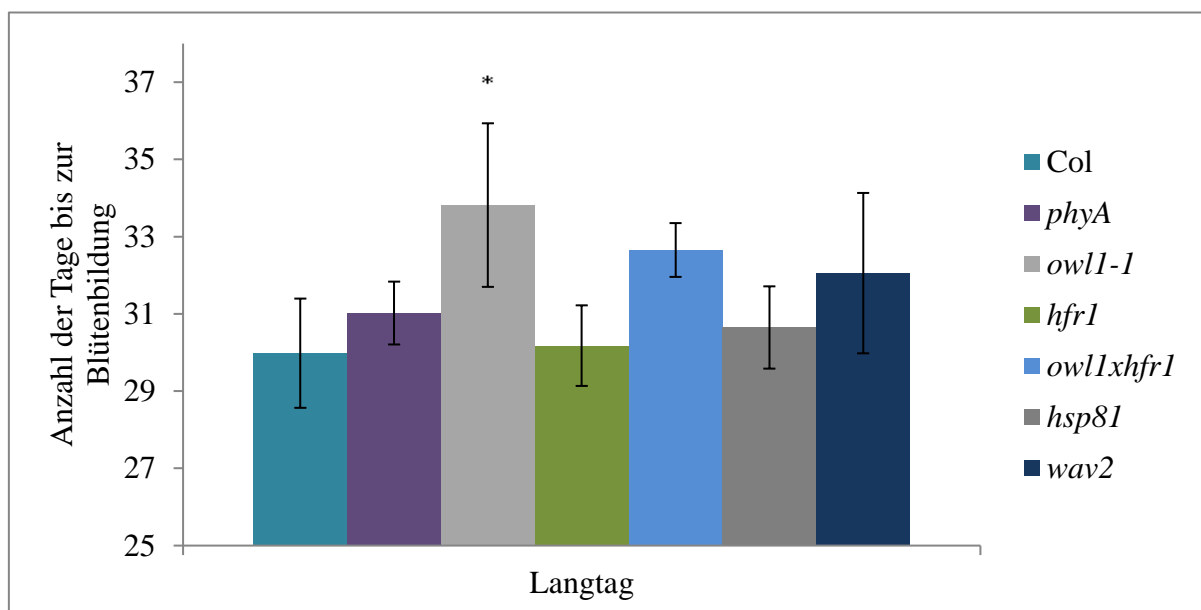


**Abbildung 19:** Hypokotyllänge verschiedener Mutantenlinien nach dreitägiger Bestrahlung mit kontinuierlichem Dunkelrotlicht (FR c 1,2  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) oder kontinuierlichem Rotlicht (R c 1,0  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Angegeben ist die Hypokotyllänge in % zur Hypokotyllänge von im Dunkeln kultivierten Keimlingen. Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. Die mit einem Stern (\*) markierten Säulen zeigen einen signifikanten Unterschied im Vergleich zum Wildtyp (Col).

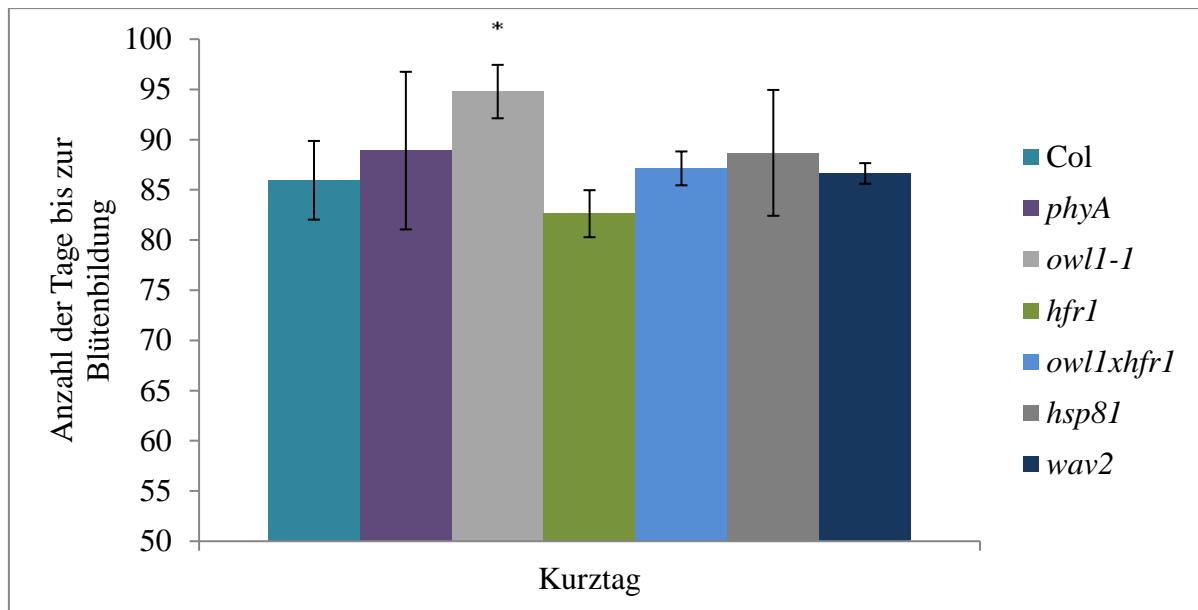
Wie in Abbildung 18 zu erkennen ist, zeigten *phyA*, *hfr1* und *owl1 x hfr1* im kontinuierlichen Dunkelrotlicht verglichen mit Wildtyp ein verlängertes Hypokotyl, für *owl1-1*, *OWL1-OE x hfr1*, *HFR1-OE x owl1*, *HFR1-OE* und *OWL1-OE x HFR1-OE* konnte kein signifikanter Effekt festgestellt werden. Unter kontinuierlichem Rotlicht zeigte nur *phyA* ein verkürztes Hypokotyl im Vergleich zum Wildtyp. Für PHYA und HFR1 konnte somit eine Rolle in der HIR bestätigt werden, für PHYA auch eine Beteiligung an der LFR. Für *wav2* und *hsp81* konnte weder unter kontinuierlichem Dunkelrotlicht noch unter kontinuierlichem Rotlicht ein signifikanter Effekt nachgewiesen werden (siehe Abbildung 19).

### 3.4.1.3 Zeitspanne bis zur Induktion der Blüte

Im folgenden Experiment wurden unterschiedliche Linien unter Langtagbedingungen (16 h WL/ Tag) und unter Kurztagbedingungen (8 h WL/ Tag) bis zum Erscheinen der Infloreszenz kultiviert und der Zeitpunkt der Blüte verglichen (siehe Abbildung 20 und Abbildung 21). So konnte die Funktion von HFR1, HSP81 und WAV2 in der adulten Pflanze untersucht werden.



**Abbildung 20:** Bestimmung des Zeitpunkts der Blühinduktion. Pflanzen wurden bis zum Erscheinen der Infloreszenz unter Langtagbedingungen (16 h WL/ Tag) auf Erde kultiviert. Durch die Fehlerbalken wird die Standardabweichung angegeben. Die mit einem Stern (\*) markierten Säulen zeigen einen signifikanten Unterschied im Vergleich zum Wildtyp (Col).



**Abbildung 21:** Bestimmung des Zeitpunkts der Blühinduktion. Pflanzen wurden bis zum Erscheinen der Infloreszenz unter Kurztagbedingungen (8 h WL/ Tag) auf Erde kultiviert. Durch die Fehlerbalken wird die Standardabweichung angegeben. Die mit einem Stern (\*) markierten Säulen zeigen einen signifikanten Unterschied im Vergleich zum Wildtyp (Col).

Unter Langtagbedingungen konnte weder für *hfr1*, noch für *hsp81* oder *wav2* ein signifikanter Effekt nachgewiesen werden. Dasselbe galt für die Kurztagbedingungen, hier blühte jedoch die Doppelmutante *owl1 x hfr1* signifikant früher als *owl1*. Das spricht dafür, dass HFR1 eine Funktion in dem verantwortlichen Signalweg besitzen könnte.

#### 3.4.1.4 Agravitropisches Wachstum unter Dunkelrotlicht

Im in Tabelle 14 und Tabelle 15 dargestellten Experiment wurden die Wachstumswinkel der verschiedenen Linien unter Dunkelrotlichtpulsen mit dem Wildtyp verglichen. Die Keimlinge wurden für drei Tage auf vertikalen Platten unter Dunkelrotlichtpulsen ( $FR_p$   $0,4 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) angezogen und der Winkel zwischen Vertikaler und Hypokotyl vermessen. Anschließend wurden die Varianzen berechnet und miteinander verglichen.

**Tabelle 14:** Vergleich der Varianzen durch Verwendung des F-Tests. Werte größer 1,0 stellen signifikante Unterschiede dar. Die Farben stellen die unterschiedlich starken Effekte dar, grün (schwach), gelb (stärker), blau (am auffälligsten).

	Col	<i>phyA</i>	<i>owl1-1</i>	<i>hfr1</i>	<i>OWL1-OE x hfr1</i>
Col		4,5	2,4	2,6	2,6
<i>phyA</i>			1,9	1,8	1,8
<i>owl1-1</i>				1,1	1,1
<i>hfr1</i>					1,0
<i>OWL1-OE x hfr1</i>					

Es konnte für alle Linien ein signifikanter Effekt nachgewiesen werden. Dieser ist jedoch unterschiedlich stark ausgeprägt. Einen besonders starken Effekt zeigte *phyA* im Vergleich zu Col. *Owl1-1*, *hfr1* und *OWL1-OE x hfr1* unterschieden sich kaum voneinander, jedoch signifikant vom Wildtyp (*OWL1-OE* siehe Tabelle 12). Auch damit bestätigte sich erneut die Rolle von PHYA und OWL1 in der VLFR. Des Weiteren sprechen die Ergebnisse dafür, dass auch HFR1 an dem verantwortlichen Signalweg beteiligt ist.

**Tabelle 15:** Vergleich der Varianzen durch Verwendung des F-Tests. Werte größer 1,0 stellen signifikante Unterschiede dar. Die Farben stellen die unterschiedlich starken Effekte dar, grün (schwach), gelb (stärker), lila (stark), blau (besonders auffällig), rot (am auffälligsten).

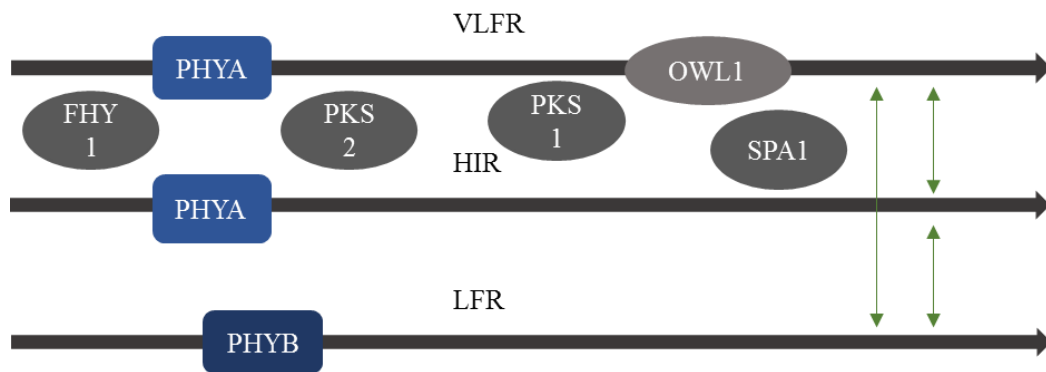
	Col	<i>phyA</i>	<i>owl1-1</i>	<i>hsp81</i>	<i>wav2</i>	<i>hsp70-1</i>	<i>pif1</i>	<i>ahl14</i>	<i>athb8</i>	<i>myb-like</i>
Col		4,5	2,4	1,2	1,0	1,1	1,2	1,0	1,0	1,1
<i>phyA</i>			1,9	3,8	4,6	4,2	5,5	4,5	4,7	4,1
<i>owl1-1</i>				2,0	2,4	2,2	2,8	2,4	2,4	2,1
<i>hsp81</i>					1,2	1,1	1,4	1,2	1,2	1,1
<i>wav2</i>						1,1	1,2	1,0	1,0	1,1
<i>hsp70-1</i>							1,3	1,1	1,1	1,0
<i>pif1</i>								1,2	1,2	1,3
<i>ahl14</i>									1,0	1,1
<i>athb8</i>										1,1
<i>myb-like</i>										

*Hsp81*, *wav2*, *hsp70-1*, *pif1*, *ahl14*, *athb8* und *myb-like* zeigten keinen ausgeprägten Effekt im Vergleich zum Wildtyp, es konnte keine Rolle in der VLFR bestätigt werden.

## 4. Diskussion

Phytochrome sind die am besten charakterisierten Photorezeptoren bei Pflanzen. PhyA und phyC sind evolutionär gesehen klar von phyB/ D und E zu trennen. PhyB und D stimmen in beinahe 80% ihrer Sequenz überein - sie sind wahrscheinlich ein Produkt einer evolutionär nicht weit zurückliegenden Genduplikation (Mathews et al. 1997). Anhand von „knock-out“ Mutanten und Überexpressoren konnte gezeigt werden, dass die verschiedenen Phytochrome sowohl unterschiedliche als auch gemeinsame Funktionen besitzen (Whitelam et al. 1997). PhyA und PhyB spielen überwiegend eine Rolle bei der Keimung und der Entwicklung des Keimlings (Nagatani et al. 1993, Reed et al. 1993). Phytochrome sind nicht unabhängig, sondern funktionieren als Teil eines Netzwerkes zu welchem andere Phytochrome und die Blaulicht-Rezeptoren Cryptochrome gehören (Casal 2000, Neff et al. 2000). Für phyA und phyB konnte ein synergistischer Effekt gezeigt werden (Casal 1995). Es konnten auch inhibitorische Interaktionen von Photorezeptoren nachgewiesen werden. So wird zum Beispiel die VLFR von phyA und die HIR durch phyB gehemmt (Hennig et al. 2001). Überexpression von PHYB verringert die Inhibierung der Hypokotylelongation bei Dunkelrotlicht (Wagner et al. 1996). PhyB kann die Wachstumsantwort auf Rotlichtpulse nur in Abwesenheit von phyA vermitteln (Casal 1995). Die Interaktion von phyA mit phyB benötigt eine Beteiligung von FHY1 (Cerdán et al. 1999). Für das in dieser Arbeit untersuchte Protein OWL1 konnte sowohl eine Rolle in der VLFR bestätigt werden, als auch eine Interaktion mit phyB nachgewiesen werden.

Es gibt einige Mutanten des phyA-Signalweges, wie „*phytochrome kinase substrate*“ (*pks*) 1, *pks2*, *spa1* und *fhy1*, die in der HIR und in der VLFR gestört sind (Cerdán et al. 1999, Hoecker et al. 1999, Baumgardt et al. 2002, Lariguet et al. 2003). Das zeigt, dass sich diese beiden Signalwege zumindest teilweise überschneiden und gemeinsame Komponenten besitzen (siehe Abbildung 22). Eine mögliche Theorie wäre, dass sich bei der Inhibierung der Hypokotylelongation die VLFR und die HIR gegenseitig ausschließen. Bei geringen Lichtquantitäten unter Niedrigst-Fluenzen ist eine starke Hypokotylverkürzung nicht sinnvoll. Durch ein verlängertes Hypokotyl können schneller bessere Lichtbedingungen gefunden werden.



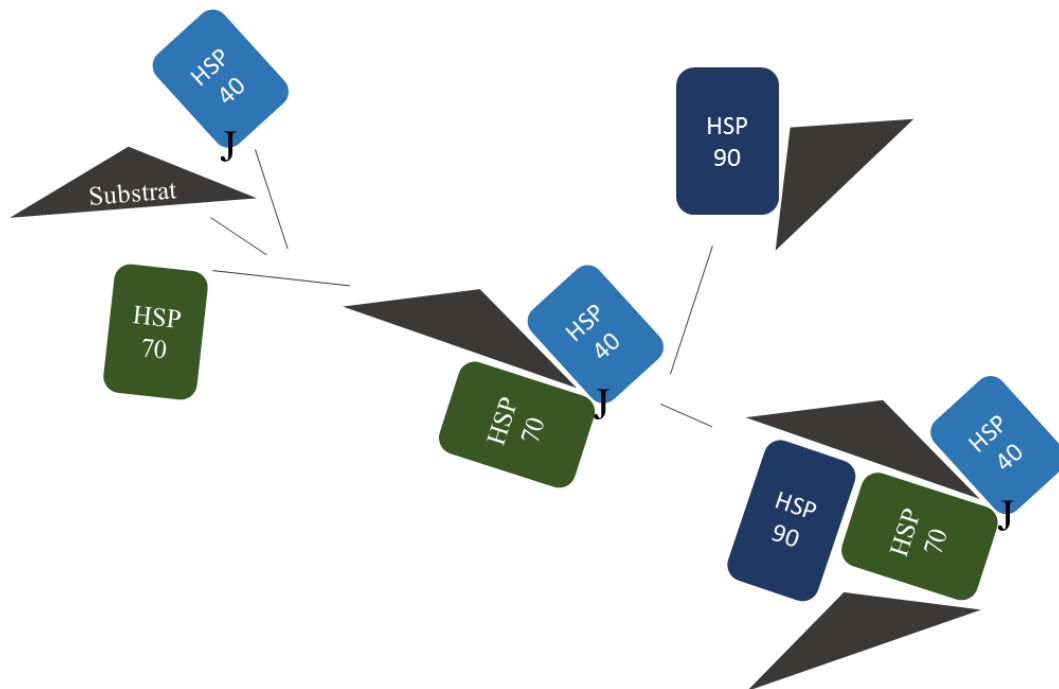
**Abbildung 22:** Darstellung der drei Signalwege VLFR, HIR und LFR mit den Hauptlichtrezeptoren PHYA/PHYB, dem an der VLFR beteiligten OWL1 und gemeinsamen Komponenten von VLFR und HIR, PKS1, PKS2, SPA1 und FHY1. Möglicher „Crosstalk“ ist grün dargestellt.

Das J-Domänen Protein OWL1 ist ein positiver Regulator spezifisch für den VLFR-Signalweg. Die stark konservierte N-terminale J-Domäne besteht aus vier aufeinanderfolgenden  $\alpha$ -Helices mit einem HPD-Tripeptid nach der zweiten Helix, welches das aktive Zentrum der J-Domäne bildet. Über weitere Aminosäuremotive werden die J-Proteine in Typ I, II und III eingeteilt. Typ I beinhaltet Hsp40-Proteine, welche neben der J-Domäne über eine Glycin-Phenylalanin-reiche Sequenz und eine Zinkfinger-ähnliche Domäne verfügen. Dem Typ II, den HSP40-ähnlichen Proteinen fehlt diese Zinkfingerdomäne. Da diese beiden Gruppen an nicht-native Peptidketten binden, handelt es sich hierbei um Cochaperone. Für Typ III Proteine, zu welchen OWL1 gehört, konnte keine Bindung an nicht-native Proteine nachgewiesen werden, diese Proteine besitzen wahrscheinlich keine Cochaperon-Funktion (Qiu et al. 2006).

Es ist bekannt, dass J-Proteine mit Hitze-Schock-Proteinen interagieren. Die Bindung erfolgt über die J-Domäne, wobei das HPD-Motiv essentiell ist (Walsh et al. 2004). HSP70-Proteine spielen eine bedeutende Rolle bei der zellulären Stressantwort und Chaperontätigkeit. Sie regulieren Proteinfaltung, -abbau und -import. HSP40-Proteine wirken als Cochaperone unterstützend bei dieser Aufgabe. HSP40 Proteine wählen das Substrat für die HSP70 und binden an nicht-native Regionen dieser Proteine. Mit ihrer konservierten J-Domäne stimulieren sie die HSP70 ATPase-Aktivität und stabilisieren so den Komplex zwischen HSP70 und den nicht-nativen Proteinen (Cyr et al. 2015).

Mittels „in vivo pull-down“ und BiFC Assay konnte für HSP70-1 und HSP70-3, mittels Hefe-Zwei-Hybrid-System und BiFC Assay für HSP81, welches zu den HSP90 gehört, eine Interaktion mit OWL1 nachgewiesen werden. Mit *hsp81-2* wurden zusätzlich

Keimungsversuche unter Dunkelrotlicht durchgeführt. Es konnte festgestellt werden, dass die Mutante eine erhöhte Dunkelkeimung aufwies. Möglicherweise wirkt sich HSP81, ähnlich PIF1, welches ein negativer Regulator der phyB-abhängigen Keimung ist, hemmend auf die Keimung aus. Ein mögliches Modell zum Zusammenwirken der HSPs ist in Abbildung 23 dargestellt.



**Abbildung 23:** HSP Maschinerie. HSP40 bindet das Substrat, stimuliert die HSP70-ATPase-Aktivität und stabilisiert so den Komplex. Zusätzlich kann HSP90 in den Komplex integriert werden.

Transkriptionsfaktoren könnten mögliche Substrate dieser HSP Maschinerie sein. Es wurde schon zuvor gezeigt, dass OWL1 mit HFR1 interagiert (Kneissl et al. 2009). Durch Verwendung des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems war es möglich die Interaktion von OWL1 mit dem bHLH-Protein HFR1 zu bestätigen. Außerdem konnte die Rolle der einzelnen Domänen von OWL1 und HFR1 überprüft werden (siehe Abbildung 24). Der Transkriptionsfaktor HFR1 ist ein positiver Regulator der phyA-vermittelten HIR und interagiert indirekt durch Komplexbildung mit Phytochromen (Duek et al. 2004) und direkt mit OWL1 (Kneissl et al. 2009). Es konnte nachgewiesen werden, dass OWL1 die J-Domäne nicht benötigt um mit HFR1 zu interagieren. Bei HFR1 ist der C-Terminus irrelevant für die Interaktion. Bei einer Komplexbildung könnte also OWL1 mit der J-Domäne an ein anderes Protein binden (wie zum Beispiel HSP70), während der C-Terminus an HFR1 gebunden ist.





**Abbildung 24:** Domänen von HFR1 und OWL1. Für die Interaktion relevante Domänen sind rot dargestellt (HFR1: N-Terminus, Helix-Loop-Helix Domäne, OWL1: C-Terminus), für diese Interaktion irrelevante Domänen grau (HFR1: C-Terminus, OWL1: J-Domäne).

Die Interaktion von OWL1 mit HFR1 konnte durch einen „Pull-Down-Assay“ *in vitro* bestätigt werden. Zur Interaktion sind verschiedene Hypothesen möglich: Da OWL1 und HFR1 beide positive Regulatoren der Photomorphogenese sind, könnten sie sich gegenseitig in der Stabilität beeinflussen. Diese Hypothese müsste durch die Bestimmung des HFR1-Gehaltes in *owl1* und *OWL1-OE*-Linien bestätigt werden. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass OWL1 und HFR1 gemeinsam an einem funktionalen Komplex beteiligt sind.

HSP81-2 gehört zur *HSP90*-Genfamilie. Es ist unter normalen Wachstumstemperaturen (22 °C) in allen Geweben stark exprimiert. In *Arabidopsis* wurden sieben Mitglieder dieser Familie identifiziert, die auf verschiedene Gewebe spezialisiert sind (Krishna et al. 2001). Die Hauptfunktion von HSP90, wie von anderen Chaperonen ist es, zu helfen Proteine korrekt zu falten. Die *HSP90*-Genfamilie spielt eine Schlüsselrolle in Signal-Transduktions-Wegen, Zell-zu-Zell-Kommunikation, Zell-Zyklus-Kontrolle, Differenzierung und Apoptose (Young et al. 2001). Es konnte gezeigt werden, dass HSP81-2 in Stressantworten involviert ist, besonders bei Stress ausgelöst durch Salz und Trockenheit. Überexpressionslinien in *Arabidopsis* zeigten eine verringerte Toleranz für Salz- und Trockenheitsstress, aber eine erhöhte Toleranz gegenüber höheren  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen (Song et al. 2009). Dies weist darauf hin, dass HSP81-2 in die Signalübertragung bei abiotischem Stress involviert ist, möglicherweise durch einen  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Signalweg. Es wurde gezeigt, dass der  $\text{Ca}^{2+}$ -Fluss einen wesentlichen Teil der gravitropischen Signalübertragung darstellt. HSP81-2 könnte den Fluss von  $\text{Ca}^{2+}$  modulieren, der für die gravitropische Signalübertragung verantwortlich ist. HSPs interagieren im molekularen Chaperon-System mit Proteinen, welche eine J-Domäne besitzen, um spezifische Substrate zu binden und deren Aktivität zu modulieren (Bukau et al. 1998). *ALTERED RESPONSE TO GRAVITY (ARG) 1* und das Paralog *ARG1-LIKE2 (ARL2)* spielen eine bedeutende Rolle bei der Signalübertragung bei

einer gravitropischen Reaktion in Wurzeln und Hypokotylen. ARG1 und ARL2 besitzen beide N-terminale J-Domänen (Guan et al. 2003). Diese Proteine könnten Interaktionspartner von HSP81-2 sein. Eine Interaktion zwischen J-Domänen Proteinen und HSPs könnte einen wichtigen Prozess zum Beispiel bei der Signalübertragung bei Gravitropismus darstellen (Schenck et al. 2013). Auch OWL1 gehört zu den J-Proteinen, die mit HSP81-2 interagieren. In einem Komplex könnten die beiden Proteine Transkriptionsfaktoren als Substrate binden und so Aktivität oder Lokalisation dieser Proteine modulieren. Ungebundene Transkriptionsfaktoren könnten von dem OWL1-HSP-Komplex gebunden und in den Kern transportiert werden.

Zur genaueren Analyse der Rolle von OWL1 in den Signalwegen wurden verschiedene physiologische Effekte untersucht: die Keimung unter Dunkelrotlicht, die Inhibierung der Hypokotylelongation, die Blühzeit, das agravitropische Wachstum und die „End-of-day far-red“-Antwort.

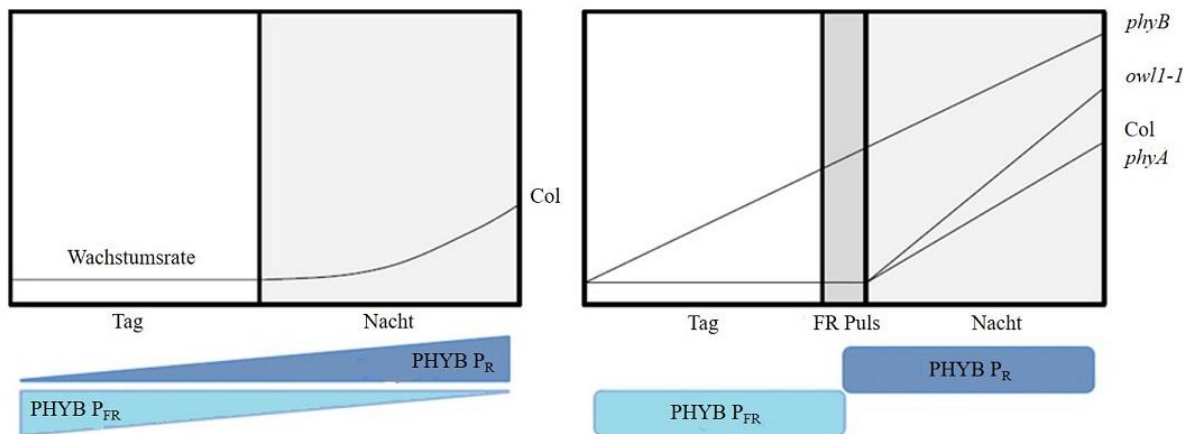
Keimung hängt von verschiedenen Umweltbedingungen wie der Position des Samens in der Erde, der Beschaffenheit der Erde und der Beschattung z.B. durch Baumkronen, ab. Die zellulären Antworten auf diese Bedingungen werden zum großen Teil über Phytochrome vermittelt (Vázquez-Yanes et al. 1982). *PHYA* vermittelt die VLFR von *A. thaliana* Samen, welche in die Förderung der Keimung von Samen im Schatten dichter Baumkronen involviert ist (Botto et al. 1996).

Bei der Keimung unter Dunkelrotlicht konnte für *owl1-1* ein intermediärer Phänotyp zwischen Col und *phyA* bestätigt werden. Auch *OWL1-OE* zeigte erhöhte Sensibilität gegenüber FR Pulsen. Die Inhibierung der Hypokotylelongation von *phyA* unter kontinuierlichem Dunkelrotlicht und unter kontinuierlichem Rotlicht bestätigte eine Rolle von *phyA* in der LFR und HIR. *Owl1-1* zeigte einen Effekt bei der Blühzeit, da jedoch keine Unterschiede zwischen Langtag- oder Kurztagbedingungen festzustellen waren, scheint zirkadiane Rhythmik keine Rolle zu spielen. Beim agravitropischen Wachstum unterschied sich *phyA* und *owl1-1* stark vom Wildtyp. Die Komplementationslinie hingegen verhielt sich ähnlich dem Wildtyp, was für eine erfolgreiche Komplementation der Mutante spricht und ausschließt, dass die beobachteten phänotypischen Effekte auf andere Ursachen als das Fehlen von OWL1 im Proteom der Pflanze zurückzuführen sind. OWL1 mit Mutation im HPD-Motiv der J-Domäne, OWL1-QPD, war nicht in der Lage, die Mutante vollständig zu komplementieren - es hat einen zumindest teilweisen Funktionsverlust erlitten. Das könnte

dadurch zu erklären sein, dass Interaktion mit anderen Proteinen, wie beispielsweise HSPs, durch die mutierte J-Domäne nicht mehr oder nur noch teilweise möglich ist.

Unter dichten Baumkronen ist vorwiegend Dunkelrotlicht zu finden, da die restlichen Wellenlängen des sichtbaren Lichts größtenteils absorbiert werden. Eine gesteigerte Elongation des Hypokotyls in Keimlingen zur Erschließung besserer Lichtverhältnisse ist essentiell für optimale Wachstumsbedingungen. Hier ist besonders das Hormon Auxin von Bedeutung, welches bei der Zellelongation eine Rolle spielt. Das Wachstum durch Elongation in Spross und Hypokotyl wird für schnelle Veränderungen der Größenverhältnisse benötigt. Es wäre denkbar, dass die Auxinproduktion dafür durch dunkelrotes Licht stimuliert wird. Die Deetiolierung der Keimlinge unter Dunkelrotlicht wird von phyA vermittelt (Yanovsky et al. 1995). PhyB ist in die Wahrnehmung von R/FR-Verhältnissen bei Beschattung durch benachbarte Pflanzen involviert (Whitelam et al. 1991). Sowohl in etiolierten Pflanzen als auch in Pflanzen, die unter guten Lichtbedingungen gewachsen sind, wirken phyA und phyB bei der Deetiolierung stark zusammen (Casal 1995, Yanovsky et al. 1995). PhyA-Aktivität verstärkt das Hypokotyl-Wachstum als Antwort auf das R/FR-Verhältnis, welches von phyB wahrgenommen wird (Casal 1996).

Im Laufe der Nacht wird phyB in seine inaktive P<sub>R</sub>-Form umgewandelt (Casal 1996). Daraufhin können Transkriptionsfaktoren akkumulieren, welche das Wachstum der Pflanze fördern. Durch einen FR-Puls wird das phyB inaktiviert, dies führt zu einer schnelleren Akkumulation von „Phytochrome interacting factors“ (PIFs) und so zu einem schnelleren Wachstum des Hypokotyls (Leivar et al. 2012) (siehe Abbildung 25). Die physiologischen Veränderungen unter FR EOD weisen auf eine Interaktion der VLFR mit der LFR hin, da *owl1-1*, *phyB* und *owl1 x phyB* ein verlängertes Hypokotyl zeigten. Die Ergebnisse führen zu der Annahme, dass OWL1 entweder einen direkten Effekt auf phyB hat oder möglicherweise die Menge an PIFs erhöht.



**Abbildung 25:** Modell zur FR EOD Antwort. Die Inaktivierung des PHYB durch den FR Puls führt zu einem schnelleren Hypokotylwachstum.

Mithilfe des „*in vivo* pull-downs“ und des „BiFC Assays“ konnte auch eine Interaktion von OWL1 mit PIF1 festgestellt werden. In Studien konnte gezeigt werden, dass PIF1 die Keimung „downstream“ von phyB unterdrückt (Shi et al. 2013). Es konnte auch eine Interaktion von OWL1 mit einem positiven Regulator der phyB-abhängigen Keimung, HFR1, bestätigt werden. HFR1 formt ein Heterodimer mit PIF1, welches PIF1 daran hindert DNA zu binden und so seine transkriptionsaktivierende Funktion auszuüben. Licht reguliert also durch die Bildung des HFR1-PIF1 Komplexes die Expression verschiedener Gene, die an Zellwandabbau, Zellteilung und Hormonsignalwegen beteiligt sind, und somit die Keimung. So kann durch geringe Bestrahlung eine schnelle Reaktion auf günstige Umweltbedingungen erreicht werden. Zusätzlich gehört HFR1 gemeinsam mit HY5 und LAF1 zu den Transkriptionsfaktoren, welche die Expression von Genen regulieren, die auf phyA reagieren. HY5 überträgt phyA Signale durch einen FHY1/FHL-unabhängigen Pfad und moduliert FHY1/FHL Signale durch Interaktion mit HFR1 und LAF1 (Jang et al. 2013). Außerdem bildet HFR1 einen Komplex mit dem bHLH-Protein PIF3. Dieser Komplex kann die P<sub>FR</sub>-Form von phyA und phyB binden (Duek et al. 2004). Eine mögliche Theorie wäre, dass OWL1 benötigt wird, um HFR1 und andere Faktoren, die wichtig für die VLFR sind, für die genannten Proteininteraktionen zu rekrutieren.

Zusätzlich zu HSP81-2, welches wahrscheinlich an dem zuvor beschriebenen Chaperon-Zyklus beteiligt ist, wurde WAV2 als Interaktor von OWL1 identifiziert. WAV2, welches zur *BUD EMERGENCE (BEM) 46* Genfamilie gehört und für eine N-terminale Transmembrandomäne und eine C-terminale  $\alpha/\beta$ -Hydrolase-Domäne kodiert, ist in die Unterdrückung der Wurzelkrümmung als Antwort auf Berührungstimuli, Schwerkraft und

Licht involviert („wellige Antwort“) (Mochizuki et al. 2005). Auxin spielt divergente Rollen in Hydrotropismus und Agravitropismus, Abszisinsäure spielt eine positive Rolle beim Hydrotropismus. Hydrotropismus und die „wellige Antwort“ besitzen möglicherweise teilweise einen gemeinsamen molekularen Weg bei der Kontrolle der Richtung des Wurzelwachstums. Das lässt sich daraus schließen, dass die Mutanten *wav2-1* und *wav3-1* erhöhte Sensibilität auf eine Induktion des Hydrotropismus zeigen (Takahashi et al. 2002). Inwiefern WAV2 an einer Komplexbildung mit OWL1 beteiligt sein könnte, müsste in weiterführenden Experimenten untersucht werden.

Um herauszufinden, welche weiteren Proteine an einer Komplexbildung beteiligt sein könnten, wurde der Versuch des „in vivo pull-down“ und der anschließenden Massenspektrometrie durchgeführt. Um zu überprüfen, ob eine Komplexbildung aufgrund der Lokalisation überhaupt möglich wäre, wurde die intrazelluläre Lokalisation von OWL1 und den putativen Interaktoren durch bimolekulare Fluoreszenzkomplementation überprüft.

Die im Folgenden beschriebenen Proteine konnten zusätzlich zu den bereits Erwähnten identifiziert werden. Das *ATHB8* Homeobox Gen ist ein Mitglied der HD-ZIP III Familie und wird während der vegetativen und reproduktiven Phase des Pflanzenwachstums exprimiert. Die Expression ist begrenzt auf prokambiale Zellen des Embryos und der sich entwickelnden Organe. Die Expression wird durch Auxin, welches in die vaskuläre Entwicklung und Differenzierung involviert ist, reguliert. Auxin ist außerdem das verantwortliche Hormon für die Hypokotylelongation und die agravitropische Bewegung (Collett et al. 2000, Finkelstein et al. 2008) und beeinflusst somit auch die Signalwege von OWL1. *ATHB8* könnte ein Regulator der vaskulären Entwicklung in Blättern von *A. thaliana* sein (Baima et al. 1995). Neuere Ergebnisse schlagen vor, dass Thermospermin, welches von *ACAULIS5* (*ACL5*) und „*BUSHY AND DWARFY2*“ (*BUD2*) produziert wird, ein Faktor ist, der „downstream“ von Auxin zur Regulation dieses Prozesses in *Arabidopsis* beiträgt (Baima et al. 2014). Durch die Kontrolle der Expression von *ACL2* und *BUD2* durch *ATHB8* könnte die Biosynthese von Thermospermin, welches an der Xylem-Differenzierung beteiligt ist, positiv reguliert werden.

In der Blattepidermis formen Paare von Schließzellen Stomata, welche Kanäle für die CO<sub>2</sub> Aufnahme für die Photosynthese bilden und den Wasserverlust der Pflanze durch Transpiration kontrollieren. Die Schließzellen reagieren autonom auf Stimuli wie Blaulicht, Temperatur, CO<sub>2</sub>, Trockenheit, Abszisinsäure und andere Hormone. Das durch „in vivo pull-

down“ und Massenspektrometrie identifizierte Protein MYB-LIKE wird stark in diesen Schließzellen exprimiert (Leonhardt et al. 2004). Inwiefern dieses Protein eine Rolle in den Signalwegen spielen könnte, an welchen OWL1 beteiligt ist, müsste in weiterführenden Experimenten untersucht werden.

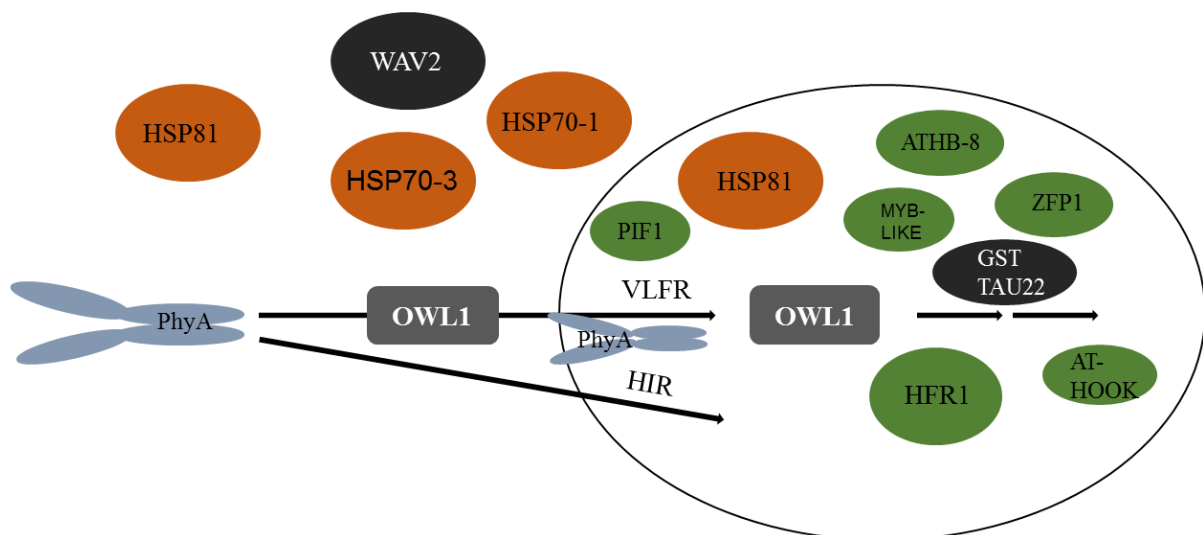
Zink-Finger Proteine spielen eine wichtige Rolle bei verschiedenen Prozessen der Pflanzenentwicklung, wie Blütenbildung, Blattinitiierung, Initiierung von Sprossen, Gametogenese und Samenentwicklung. ZFP1 ist im Apikalmeristem, in den sich entwickelnden Blättern und im sich entwickelnden vaskulären System stark exprimiert. Im Licht wird die Expression des Proteins ungefähr drei Tage nach der Keimung, vor der Expansion der Blätter induziert. Im Dunkeln, wenn die Photomorphogenese unterdrückt ist, kann keine Expression nachgewiesen werden. ZFP1 spielt möglicherweise eine Rolle bei der Spross-Entwicklung, „downstream“ der Aktivierung der Photomorphogenese (Chrispeels et al. 2000). Keimung wird durch Umweltsignale wie Licht und Phytohormone kontrolliert. Abszisinsäure (ABA) hemmt die Keimung und die Entwicklung des Keimlings, Gibberelline fördern sie. ZFP3 und auch die nahen Verwandten ZFP1, 4, 6 und 7 regulieren die zelluläre Antwort auf die Einflüsse von Licht und ABA während Keimung und früher Keimlingsentwicklung (Joseph et al. 2014). Zusätzlich fungiert ZFP1 als Transkriptionsrepressor und ist mit dieser Funktion in die Hemmung des Pflanzenwachstums unter abiotischen Stressbedingungen involviert (Kodaira et al. 2011). Für die Überexpressionslinie von ZFP1 konnte ein verzögerter Blühzeitpunkt und eine erhöhte Stresstoleranz nachgewiesen werden (Lin et al. 2011).

Über die Rolle von Gluthation S-Transferasen in der Pflanzenphysiologie und bei Reaktionen auf biotischen und abiotischen Stress ist wenig bekannt. In *A. thaliana* wurden 47 Mitglieder dieser Familie identifiziert, welche in vier Klassen eingeteilt werden (Wagner et al. 2002). Das hier identifizierte Protein GST TAU22 gehört zur pflanzenspezifischen TAU-Klasse der GSTs. FIN219-INTERACTING PROTEIN (FIP) 1, mit 67% Aminosäureidentität zu GST TAU22, gehört ebenfalls zur TAU-Klasse der GST-Genfamilie und besitzt Gluthation S-Transferase-Aktivität. Für dieses Protein konnte eine Interaktion mit FAR-RED INSENSITIVE (FIN) 219, welches in den von phyA vermittelten FR-Signalweg involviert ist, nachgewiesen werden. *Fip1* zeigt unter Langtag-Bedingungen einen Phänotyp betreffend Hypokotylwachstum und Blühzeitpunkt (Chen et al. 2007).

Das Genom von *A. thaliana* enkodiert 29 AT-HOOK MOTIF CONTAINING NUCLEAR LOCALIZED (AHL) Gene. Die AHL Proteine besitzen ein bis zwei At-hook Motive und eine PPC-Domäne unbekannter Funktion DUF296. Mithilfe dieser PPC/DUF296 Domäne interagieren AHLs miteinander, bilden Komplexe mit anderen nuklearen Proteinen und modulieren so das Hypokotylwachstum (Zhao et al. 2013).

Zur genaueren Analyse der Interaktion von OWL1 mit GST TAU22 und AHL14 sollten weiterführende Experimente zu einem möglichen Phänotyp von *gst tau22* und *ahl14* durchgeführt werden.

Es gibt also die Möglichkeit, dass OWL1 zusammen mit den in Abbildung 26 dargestellten Proteinen Bestandteil eines funktionalen Komplexes ist. Dafür spricht, dass die Proteine in den gleichen Strukturen kolokalisieren. Möglicherweise dienen die Transkriptionsfaktoren als Substrate für die Hitze-Schock-Proteine. Es wurde auch untersucht, ob die identifizierten Proteine in die VLFR involviert sein könnten. Mit den putativen Interaktoren wurden physiologische Untersuchungen zu Keimung, Hypokotyllänge, Blühzeit und Agravitropismus durchgeführt. Da die einzig bekannte Aufgabe der J-Domäne die Interaktion mit HSP-Proteinen ist, könnte ein Komplex HFR1, OWL1, HSP-Proteine und Substrat-Proteine enthalten. Die Zusammensetzung dieses Komplexes könnte je nach Lichtbedingungen variieren. Es liegt die Vermutung nahe, dass OWL1 Bestandteil mehrerer Proteinkomplexe ist und es somit möglicherweise eine zentrale regulatorische Funktion besitzt.



**Abbildung 26:** Mögliche Bestandteile eines oder mehrerer Proteinkomplexe: PHYA, OWL1, WAV2, GST TAU22 (grau), Hitze-Schock-Proteine (orange) und Transkriptionsfaktoren (grün), aufgeteilt nach Lokalisation (Zytosol, Zellkern) dargestellt in dem betroffenen Signalweg VLFR.

Fraglich ist, wie die Interaktion von OWL1 mit seinen Interaktionspartnern reguliert wird. Möglicherweise bestimmt das HSP, welches von OWL1 gebunden wird darüber, welcher Transkriptionsfaktor Teil des Komplexes ist und welche Gene dementsprechend in ihrer Transkription moduliert werden. Durch welchen Mechanismus determiniert wird, welches HSP von OWL1 gebunden wird, bleibt jedoch unklar.



## 5. Zusammenfassung

Als sessile, photoautotrophe Organismen ist es für Pflanzen essentiell, die verschiedenen Umwelteinflüsse wahrzunehmen und darauf zu reagieren. Zur Wahrnehmung der unterschiedlichen Lichtverhältnisse für die lichtabhängige Entwicklung, die Photomorphogenese, haben Pflanzen verschiedene Familien an hochsensiblen Photorezeptoren entwickelt. Die Familie der Phytochrome ist für die Rot- und Dunkelrotlichtperzeption verantwortlich. Sie werden in *A. thaliana* durch fünf verschiedene Gene kodiert, *PHYA*, *B*, *C*, *D* und *E*. Phytochrome sind an den drei Signalwegen Niedrig-Fluenz-Antwort („low-fluence-response“, LFR), Niedrigst-Fluenz-Antwort („very-low-fluence-response“, VLFR) und Hochintensitäts-Reaktion („high-irradiance-response“, HIR) beteiligt. PhyB übernimmt die Rolle des Hauptrotlichtrezeptors bei der LFR, während phyA den einzigen Dunkelrotlichtrezeptor darstellt und eine Rolle bei der VLFR und der HIR spielt. Die Mutante *owl1-1* weist spezifische Defekte in der VLFR auf, aber sie ist nicht in der HIR behindert. Für das J-Domänen Protein OWL1 konnte gezeigt werden, dass es eine Rolle bei Keimung, Kotyledonenöffnung, Hypokotylelongation und agravitropischem Wachstum unter VLF-Bedingungen spielt. Da zusätzlich ein Phänotyp nachgewiesen wurde, der die Blühzeit betrifft, liegt die Vermutung nahe, dass OWL1 eine Rolle im gesamten Lebenszyklus der Pflanze spielt. Im Rahmen dieser Arbeit konnte für OWL1 sowohl eine Beteiligung an der VLFR bestätigt, als auch eine Interaktion mit der von phyB vermittelten LFR nachgewiesen werden. Dies deutet auf eine Verknüpfung der VLFR mit der LFR hin. Zusätzlich wurde bestätigt, dass OWL1 mit dem bHLH-Transkriptionsfaktor HFR1 interagiert, welcher eine Komponente der HIR darstellt. Bei Versuchen hinsichtlich der Domänenstruktur dieser beiden Proteine wurde festgestellt, dass für die Interaktion der C-Terminus von OWL1 und der N-Terminus und die Helix-Loop-Helix Domäne von HFR1 von Bedeutung sind. Als weitere Interaktoren wurden die Hitze-Schock-Proteine HSP70-1, HSP70-3 und HSP81-2 identifiziert. Diese Interaktion erfolgt über eine Bindung der J-Domäne von OWL1, wobei das HPD-Motiv essentiell ist. In einer möglichen HSP Maschinerie bindet OWL1, welches zu den HSP40 gehört, ein Substrat, stimuliert die HSP70-ATPase-Aktivität und stabilisiert so den Komplex. Zusätzlich kann noch ein HSP90, beispielsweise HSP81-2, in den Komplex integriert werden. Transkriptionsfaktoren könnten mögliche Substrate dieser HSP Maschinerie sein. Es konnte gezeigt werden, dass OWL1 mit dem „phytochrome-interacting factor“ (PIF) 1 interagiert, welcher ein negativer Regulator der phyB-abhängigen Keimung ist

und mit dem positiven Regulator HFR1 Heterodimere bildet und so die Keimung reguliert. Außerdem wurde eine Interaktion mit WAV2 nachgewiesen, welches in den molekularen Weg bei der Kontrolle der Richtung des Wurzelwachstums involviert ist. Das Homeobox-Gen *ATHB8* ist ein Regulator der vaskulären Entwicklung in Blättern. Seine Expression wird durch Auxin reguliert, welches außerdem das verantwortliche Hormon für Hypokotylelongation und agravitropische Bewegung ist. Das Protein MYB-LIKE wird stark in Schließzellen exprimiert, die autonom auf Stimuli wie Blaulicht, Temperatur, CO<sub>2</sub>, Trockenheit und Abszisinsäure reagieren. Das ZINK-FINGER PROTEIN 1 (ZFP1) reguliert Licht- und ABA-abhängige zelluläre Prozesse während Keimung und früher Keimlingsentwicklung und fungiert als transkriptionaler Repressor involviert in die Hemmung des Pflanzenwachstums unter abiotischen Stressbedingungen. Über die Funktion der Glutathion S-Transferase GST TAU22 ist bisher nichts bekannt. AT-HOOK MOTIF CONTAINING NUCLEAR LOCALIZED (AHL) Proteine bilden Komplexe mit anderen nuklearen Proteinen und modulieren so das Hypokotylwachstum. OWL1 ist also möglicherweise zusammen mit diesen Proteinen Bestandteil eines oder mehrerer funktionaler Komplexe.

## 6. Literatur

Ádám, É., S. Kircher, P. Liu, Z. Mérai, N. González-Schain, M. Hörner, A. Viczián, E. Monte, R. A. Sharrock, E. Schäfer and F. Nagy (2013). "Comparative functional analysis of full-length and N-terminal fragments of phytochrome C, D and E in red light-induced signaling." New Phytologist **200**(1): 86-96.

Ahmad, M., J. A. Jarillo, L. J. Klimczak, L. G. Landry, T. Peng, R. L. Last and A. R. Cashmore (1997). "An enzyme similar to animal type II photolyases mediates photoreactivation in Arabidopsis." The Plant Cell **9**(2): 199-207.

Bae, G. and G. Choi (2008). "Decoding of Light Signals by Plant Phytochromes and Their Interacting Proteins." Annual Review of Plant Biology **59**(1): 281-311.

Baima, S., V. Forte, M. Possenti, A. Peñalosa, G. Leoni, S. Salvi, B. Felici, I. Ruberti and G. Morelli (2014). "Negative Feedback Regulation of Auxin Signaling by ATHB8/ACL5 and BUD2 Transcription Module." Molecular Plant **7**(6): 1006-1025.

Baima, S., F. Nobili, G. Sessa, S. Lucchetti, I. Ruberti and G. Morelli (1995). "The expression of the Athb-8 homeobox gene is restricted to provascular cells in Arabidopsis thaliana." Development **121**(12): 4171-4182.

Bauer, D., A. Viczián, S. Kircher, T. Nobis, R. Nitschke, T. Kunkel, K. C. S. Panigrahi, É. Ádám, E. Fejes, E. Schäfer and F. Nagy (2004). "Constitutive Photomorphogenesis 1 and Multiple Photoreceptors Control Degradation of Phytochrome Interacting Factor 3, a Transcription Factor Required for Light Signaling in Arabidopsis." The Plant Cell **16**(6): 1433-1445.

Baumgardt, R.-L., K. A. Oliverio, J. J. Casal and U. Hoecker (2002). "SPA1, a component of phytochrome A signal transduction, regulates the light signaling current." Planta **215**(5): 745-753.

Bolle, C., C. Koncz and N.-H. Chua (2000). "PAT1, a new member of the GRAS family, is involved in phytochrome A signal transduction." Genes & Development **14**(10): 1269-1278.

Botto, J. F., R. A. Sanchez, G. C. Whitelam and J. J. Casal (1996). "Phytochrome A Mediates the Promotion of Seed Germination by Very Low Fluences of Light and Canopy Shade Light in Arabidopsis." Plant Physiology **110**(2): 439-444.

Bukau, B. and A. L. Horwich (1998). "The Hsp70 and Hsp60 Chaperone Machines." Cell **92**(3): 351-366.

Burgie, E. S., A. N. Bussell, J. M. Walker, K. Dubiel and R. D. Vierstra (2014). "Crystal structure of the photosensing module from a red/far-red light-absorbing plant phytochrome." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **111**(28): 10179-10184.

Casal, J. J. (1995). "Coupling of phytochrome B to the control of hypocotyl growth in Arabidopsis." Planta **196**(1): 23-29.

- Casal, J. J. (1996). "Phytochrome A enhances the promotion of hypocotyl growth caused by reductions in levels of phytochrome B in its far-red-light-absorbing form in light-grown *Arabidopsis thaliana*." Plant Physiology **112**(3): 965-973.
- Casal, J. J. (2000). "Phytochromes, Cryptochromes, Phototropin: Photoreceptor Interactions in Plants." Photochemistry and Photobiology **71**(1): 1-11.
- Casal, J. J. (2012). "Shade avoidance." Arabidopsis Book **10**: e0157.
- Casal, J. J. (2013). "Photoreceptor signaling networks in plant responses to shade." Annu Rev Plant Biol **64**: 403-427.
- Casal, J. J., A. N. Candia and R. Sellaro (2013). "Light perception and signalling by phytochrome A." J Exp Bot **65**(11): 2835-2845.
- Casal, J. J., P. D. Cerdán, R. J. Staneloni and L. Cattaneo (1998). "Different Phototransduction Kinetics of Phytochrome A and Phytochrome B in *Arabidopsis thaliana*." Plant Physiology **116**(4): 1533-1538.
- Cerdán, P. D., M. J. Yanovsky, F. C. Reymundo, A. Nagatani, R. J. Staneloni, G. C. Whitelam and J. J. Casal (1999). "Regulation of phytochrome B signaling by phytochrome A and FHY1 in *Arabidopsis thaliana*." The Plant Journal **18**(5): 499-507.
- Chen, I.-C., I. C. Huang, M.-J. Liu, Z.-G. Wang, S.-S. Chung and H.-L. Hsieh (2007). "Glutathione S-Transferase Interacting with Far-Red Insensitive 219 Is Involved in Phytochrome A-Mediated Signaling in *Arabidopsis*." Plant Physiology **143**(3): 1189-1202.
- Cho, H.-Y., T.-S. Tseng, E. Kaiserli, S. Sullivan, J. M. Christie and W. R. Briggs (2007). "Physiological Roles of the Light, Oxygen, or Voltage Domains of Phototropin 1 and Phototropin 2 in *Arabidopsis*." Plant Physiology **143**(1): 517-529.
- Chrispeels, H. E., H. Oettinger, N. Janvier and B. W. Tague (2000). "AtZFP1, encoding *Arabidopsis thaliana* C2H2 zinc-finger protein 1, is expressed downstream of photomorphogenic activation." Plant Molecular Biology **42**(2): 279-290.
- Christie, J. M. (2007). "Phototropin Blue-Light Receptors." Annual Review of Plant Biology **58**(1): 21-45.
- Christie, J. M., L. Blackwood, J. Petersen and S. Sullivan (2015). "Plant Flavoprotein Photoreceptors." Plant and Cell Physiology **56**(3): 401-413.
- Clack, T., S. Mathews and R. Sharrock (1994). "The phytochrome apoprotein family in *Arabidopsis* is encoded by five genes: the sequences and expression of PHYD and PHYE." Plant Molecular Biology **25**(3): 413-427.
- Collett, C. E., N. P. Harberd and O. Leyser (2000). "Hormonal Interactions in the Control of *Arabidopsis* Hypocotyl Elongation." Plant Physiology **124**(2): 553-562.
- Conrad, K. S., C. C. Manahan and B. R. Crane (2014). "Photochemistry of Flavoprotein Light Sensors." Nature Chemical Biology **10**(10): 801-809.

- Cyr, M. D. and H. C. Ramos (2015). Specification of Hsp70 Function by Type I and Type II Hsp40. The Networking of Chaperones by Co-chaperones: Control of Cellular Protein Homeostasis. L. G. Blatch and L. A. Edkins. Cham, Springer International Publishing: 91-102.
- Duek, P. D., M. V. Elmer, V. R. van Oosten and C. Fankhauser (2004). "The Degradation of HFR1, a Putative bHLH Class Transcription Factor Involved in Light Signaling, Is Regulated by Phosphorylation and Requires COP1." Current Biology **14**(24): 2296-2301.
- Duek, P. D. and C. Fankhauser (2003). "HFR1, a putative bHLH transcription factor, mediates both phytochrome A and cryptochrome signalling." The Plant Journal **34**(6): 827-836.
- El-Din El-Assal, S., C. Alonso-Blanco, A. J. M. Peeters, C. Wagemaker, J. L. Weller and M. Koornneef (2003). "The Role of Cryptochrome 2 in Flowering in Arabidopsis." Plant Physiology **133**(4): 1504-1516.
- Fairchild, C. D., M. A. Schumaker and P. H. Quail (2000). "HFR1 encodes an atypical bHLH protein that acts in phytochrome A signal transduction." Genes & Development **14**(18): 2377-2391.
- Finkelstein, R., W. Reeves, T. Ariizumi and C. Steber (2008). "Molecular Aspects of Seed Dormancy." Annual Review of Plant Biology **59**(1): 387-415.
- Genevaux, P., F. Schwager, C. Georgopoulos and W. L. Kelley (2002). "Scanning mutagenesis identifies amino acid residues essential for the in vivo activity of the Escherichia coli DnaJ (Hsp40) J-domain." Genetics **162**(3): 1045-1053.
- Genoud, T., F. Schweizer, A. Tscheuschler, D. Debrieux, J. J. Casal, E. Schäfer, A. Hiltbrunner and C. Fankhauser (2008). "FHY1 Mediates Nuclear Import of the Light-Activated Phytochrome A Photoreceptor." PLoS Genetics **4**(8): e1000143.
- Green, M. R. and J. Sambrook (2012). Molecular cloning : a laboratory manual. Cold Spring Harbor, N.Y, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Guan, C., E. S. Rosen, K. Boonsirichai, K. L. Poff and P. H. Masson (2003). "The ARG1-LIKE2 Gene of Arabidopsis Functions in a Gravity Signal Transduction Pathway That Is Genetically Distinct from the PGM Pathway." Plant Physiology **133**(1): 100-112.
- Heijde, M. and R. Ulm (2012). "UV-B photoreceptor-mediated signalling in plants." Trends in Plant Science **17**(4): 230-237.
- Hennig, L., C. Poppe, U. Sweere, A. Martin and E. Schäfer (2001). "Negative Interference of Endogenous Phytochrome B with Phytochrome A Function in Arabidopsis." Plant Physiology **125**(2): 1036-1044.
- Hoecker, U. and P. H. Quail (2001). "The phytochrome A-specific signaling intermediate SPA1 interacts directly with COP1, a constitutive repressor of light signaling in Arabidopsis." Journal of Biological Chemistry.
- Hoecker, U., J. M. Tepperman and P. H. Quail (1999). "SPA1, a WD-Repeat Protein Specific to Phytochrome A Signal Transduction." Science **284**(5413): 496-499.

- Hsieh, H.-L., H. Okamoto, M. Wang, L.-H. Ang, M. Matsui, H. Goodman and X. W. Deng (2000). "FIN219, an auxin-regulated gene, defines a link between phytochrome A and the downstream regulator COP1 in light control of Arabidopsis development." Genes & Development **14**(15): 1958-1970.
- Jang, I.-C., R. Henriques and N.-H. Chua (2013). "Three Transcription Factors, HFR1, LAF1 and HY5, Regulate Largely Independent Signaling Pathways Downstream of Phytochrome A." Plant and Cell Physiology **54**(6): 907-916.
- Jang, I.-C., J.-Y. Yang, H. S. Seo and N.-H. Chua (2005). "HFR1 is targeted by COP1 E3 ligase for post-translational proteolysis during phytochrome A signaling." Genes & Development **19**(5): 593-602.
- Jang, I. C., S. W. Yang, J. Y. Yang and N. H. Chua (2007). "Independent and interdependent functions of LAF1 and HFR1 in phytochrome A signaling." Genes Dev **21**(16): 2100-2111.
- Joseph, M. P., C. Papdi, L. Kozma-Bognár, I. Nagy, M. López-Carbonell, G. Rigó, C. Koncz and L. Szabados (2014). "The Arabidopsis ZINC FINGER PROTEIN3 Interferes with Abscisic Acid and Light Signaling in Seed Germination and Plant Development." Plant Physiology **165**(3): 1203-1220.
- Kami, C., S. Lorrain, P. Hornitschek and C. Fankhauser (2010). Chapter Two - Light-Regulated Plant Growth and Development. Current Topics in Developmental Biology. C. P. T. Marja, Academic Press. **Volume 91**: 29-66.
- Karimi, M., D. Inzé and A. Depicker (2002). "GATEWAY™ vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation." Trends in Plant Science **7**(5): 193-195.
- Kim, J.-I., G. V. Kozhukh and P.-S. Song (2002). "Phytochrome-mediated signal transduction pathways in plants." Biochemical and Biophysical Research Communications **298**(4): 457-463.
- Kneissl, J., T. Shinomura, M. Furuya and C. Bolle (2008). "A Rice Phytochrome A in Arabidopsis: The Role of the N-terminus under red and far-red light." Molecular Plant **1**(1): 84-102.
- Kneissl, J., V. Wachtler, N. H. Chua and C. Bolle (2009). "OWL1: an Arabidopsis J-domain protein involved in perception of very low light fluences." Plant Cell **21**(10): 3212-3225.
- Kodaira, K.-S., F. Qin, L.-S. P. Tran, K. Maruyama, S. Kidokoro, Y. Fujita, K. Shinozaki and K. Yamaguchi-Shinozaki (2011). "Arabidopsis Cys2/His2 Zinc-Finger Proteins AZF1 and AZF2 Negatively Regulate Abscisic Acid-Repressive and Auxin-Inducible Genes under Abiotic Stress Conditions." Plant Physiology **157**(2): 742-756.
- Krishna, P. and G. Gloor (2001). "The Hsp90 family of proteins in Arabidopsis thaliana." Cell Stress & Chaperones **6**(3): 238-246.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-685.

- Lariguet, P., H. E. Boccacalandro, J. M. Alonso, J. R. Ecker, J. Chory, J. J. Casal and C. Fankhauser (2003). "A Growth Regulatory Loop That Provides Homeostasis to Phytochrome A Signaling." The Plant Cell **15**(12): 2966-2978.
- Leivar, P., E. Monte, M. M. Cohn and P. H. Quail (2012). "Phytochrome Signaling in Green Arabidopsis Seedlings: Impact Assessment of a Mutually Negative phyB–PIF Feedback Loop." Molecular Plant **5**(3): 208-223.
- Leivar, P., E. Monte, Y. Oka, T. Liu, C. Carle, A. Castillon, E. Huq and P. H. Quail (2008). "Multiple Phytochrome-Interacting bHLH Transcription Factors Repress Premature Seedling Photomorphogenesis in Darkness." Current Biology **18**(23): 1815-1823.
- Leivar, P. and P. H. Quail (2011). "PIFs: pivotal components in a cellular signaling hub." Trends in plant science **16**(1): 19-28.
- Leonhardt, N., J. M. Kwak, N. Robert, D. Waner, G. Leonhardt and J. I. Schroeder (2004). "Microarray Expression Analyses of Arabidopsis Guard Cells and Isolation of a Recessive Absciscic Acid Hypersensitive Protein Phosphatase 2C Mutant." The Plant Cell **16**(3): 596-615.
- Li, Q.-H. and H.-Q. Yang (2007). "Cryptochrome Signaling in Plants." Photochemistry and Photobiology **83**(1): 94-101.
- Lin, C. and D. Shalitin (2003). "CRYPTOCHROME STRUCTURE AND SIGNAL TRANSDUCTION." Annual Review of Plant Biology **54**(1): 469-496.
- Lin, P.-C., M. C. Pomeranz, Y. Jikumaru, S. G. Kang, C. Hah, S. Fujioka, Y. Kamiya and J.-C. Jang (2011). "The Arabidopsis tandem zinc finger protein AtTZF1 affects ABA- and GA-mediated growth, stress and gene expression responses." The Plant Journal **65**(2): 253-268.
- Liu, J. Z. and S. A. Whitham (2013). "Overexpression of a soybean nuclear localized type-III DnaJ domain-containing HSP40 reveals its roles in cell death and disease resistance." Plant J **74**(1): 110-121.
- Mathews, S. and R. A. Sharrock (1997). "Phytochrome gene diversity." Plant, Cell & Environment **20**(6): 666-671.
- Mochizuki, S., A. Harada, S. Inada, K. Sugimoto-Shirasu, N. Stacey, T. Wada, S. Ishiguro, K. Okada and T. Sakai (2005). "The Arabidopsis WAVY GROWTH 2 protein modulates root bending in response to environmental stimuli." Plant Cell **17**(2): 537-547.
- Monte, E., B. Al-Sady, P. Leivar and P. H. Quail (2007). "Out of the dark: how the PIFs are unmasking a dual temporal mechanism of phytochrome signalling." Journal of Experimental Botany **58**(12): 3125-3133.
- Nagatani, A., J. W. Reed and J. Chory (1993). "Isolation and Initial Characterization of Arabidopsis Mutants That Are Deficient in Phytochrome A." Plant Physiology **102**(1): 269-277.
- Nagy, F., S. Kircher and E. Schafer (2001). "Intracellular trafficking of photoreceptors during light-induced signal transduction in plants." Journal of Cell Science **114**(3): 475-480.

- Neff, M. M., C. Fankhauser and J. Chory (2000). "Light: an indicator of time and place." Genes & Development **14**(3): 257-271.
- Ni, W., S.-L. Xu, R. J. Chalkley, T. N. D. Pham, S. Guan, D. A. Maltby, A. L. Burlingame, Z.-Y. Wang and P. H. Quail (2013). "Multisite Light-Induced Phosphorylation of the Transcription Factor PIF3 Is Necessary for Both Its Rapid Degradation and Concomitant Negative Feedback Modulation of Photoreceptor phyB Levels in Arabidopsis." The Plant Cell **25**(7): 2679-2698.
- Osterlund, M. T. and X.-W. Deng (1998). "Multiple photoreceptors mediate the light-induced reduction of GUS-COP1 from Arabidopsis hypocotyl nuclei." The Plant Journal **16**(2): 201-208.
- Pfeiffer, A., M.-K. Nagel, C. Popp, F. Wüst, J. Bindics, A. Viczián, A. Hiltbrunner, F. Nagy, T. Kunkel and E. Schäfer (2012). "Interaction with plant transcription factors can mediate nuclear import of phytochrome B." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **109**(15): 5892-5897.
- Poppe, C., R. P. Hangarter, R. A. Sharrock, F. Nagy and E. Schäfer (1996). "The light-induced reduction of the gravitropic growth-orientation of seedlings of Arabidopsis thaliana (L.) Heynh. is a photomorphogenic response mediated synergistically by the far-red-absorbing forms of phytochromes A and B." Planta **199**(4): 511-514.
- Qiu, X. B., Y. M. Shao, S. Miao and L. Wang (2006). "The diversity of the DnaJ/Hsp40 family, the crucial partners for Hsp70 chaperones." Cell Mol Life Sci **63**(22): 2560-2570.
- Reed, J. W., P. Nagpal, D. S. Poole, M. Furuya and J. Chory (1993). "Mutations in the gene for the red/far-red light receptor phytochrome B alter cell elongation and physiological responses throughout Arabidopsis development." The Plant Cell **5**(2): 147-157.
- Robson, P. and H. Smith (1996). "Genetic and Transgenic Evidence That Phytochromes A and B Act to Modulate the Gravitropic Orientation of Arabidopsis thaliana Hypocotyls." Plant Physiology **110**(1): 211-216.
- Rockwell, N. C., Y. S. Su and J. C. Lagarias (2006). "Phytochrome structure and signaling mechanisms." Annual Review of Plant Biology **57**: 837-858.
- Saijo, Y., J. A. Sullivan, H. Wang, J. Yang, Y. Shen, V. Rubio, L. Ma, U. Hoecker and X. W. Deng (2003). "The COP1-SPA1 interaction defines a critical step in phytochrome A-mediated regulation of HY5 activity." Genes & Development **17**(21): 2642-2647.
- Sakamoto, A., V. T. T. Lan, Y. Hase, N. Shikazono, T. Matsunaga and A. Tanaka (2003). "Disruption of the AtREV3 Gene Causes Hypersensitivity to Ultraviolet B Light and  $\gamma$ -Rays in Arabidopsis: Implication of the Presence of a Translesion Synthesis Mechanism in Plants." The Plant Cell **15**(9): 2042-2057.
- Schenck, C. A., V. Nadella, S. L. Clay, J. Lindner, Z. Abrams and S. E. Wyatt (2013). "A proteomics approach identifies novel proteins involved in gravitropic signal transduction." American Journal of Botany **100**(1): 194-202.



- Seo, H. S., J.-Y. Yang, M. Ishikawa, C. Bolle, M. L. Ballesteros and N.-H. Chua (2003). "LAF1 ubiquitination by COP1 controls photomorphogenesis and is stimulated by SPA1." Nature **423**(6943): 995-999.
- Shi, H., S. Zhong, X. Mo, N. Liu, C. D. Nezames and X. W. Deng (2013). "HFR1 sequesters PIF1 to govern the transcriptional network underlying light-initiated seed germination in *Arabidopsis*." Plant Cell **25**(10): 3770-3784.
- Shinomura, T., A. Nagatani, H. Hanzawa, M. Kubota, M. Watanabe and M. Furuya (1996). "Action spectra for phytochrome A- and B-specific photoinduction of seed germination in *Arabidopsis thaliana*." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **93**(15): 8129-8133.
- Song, H., R. Zhao, P. Fan, X. Wang, X. Chen and Y. Li (2009). "Overexpression of AtHsp90.2, AtHsp90.5 and AtHsp90.7 in *Arabidopsis thaliana* enhances plant sensitivity to salt and drought stresses." Planta **229**(4): 955-964.
- Sullivan, J. A. and X. W. Deng (2003). "From seed to seed: the role of photoreceptors in *Arabidopsis* development." Developmental Biology **260**(2): 289-297.
- Takahashi, N., N. Goto, K. Okada and H. Takahashi (2002). "Hydrotropism in abscisic acid, wavy, and gravitropic mutants of *Arabidopsis thaliana*." Planta **216**(2): 203-211.
- Vázquez-Yanes, C. and H. Smith (1982). "PHYTOCHROME CONTROL OF SEED GERMINATION IN THE TROPICAL RAIN FOREST PIONEER TREES CECROPIA OBTUSIFOLIA AND PIPER AURITUM AND ITS ECOLOGICAL SIGNIFICANCE." New Phytologist **92**(4): 477-485.
- Wagner, D., M. Koloszvari and P. H. Quail (1996). "Two Small Spatially Distinct Regions of Phytochrome B Are Required for Efficient Signaling Rates." The Plant Cell **8**(5): 859-871.
- Wagner, U., R. Edwards, D. P. Dixon and F. Mauch (2002). "Probing the Diversity of the *Arabidopsis* glutathione S-Transferase Gene Family." Plant Molecular Biology **49**(5): 515-532.
- Walsh, P., D. Bursac, Y. C. Law, D. Cyr and T. Lithgow (2004). "The J-protein family: modulating protein assembly, disassembly and translocation." EMBO Rep **5**(6): 567-571.
- Wang, H. and X. W. Deng (2002). "Phytochrome Signaling Mechanism." The Arabidopsis Book: e0074.0071.
- Whitelam, G. C. and P. F. Devlin (1997). "Roles of different phytochromes in *Arabidopsis* photomorphogenesis." Plant, Cell & Environment **20**(6): 752-758.
- Whitelam, G. C. and H. Smith (1991). "Retention of Phytochrome-Mediated Shade Avoidance Responses in Phytochrome-Deficient Mutants of *Arabidopsis*, Cucumber and Tomato." Journal of Plant Physiology **139**(1): 119-125.
- Wu, S. H. (2014). "Gene expression regulation in photomorphogenesis from the perspective of the central dogma." Annu Rev Plant Biol **65**: 311-333.

Yanovsky, M. J., J. J. Casal and G. C. Whitelam (1995). "Phytochrome A, phytochrome B and HY4 are involved in hypocotyl growth responses to natural radiation in Arabidopsis: weak de-etiolation of the phyA mutant under dense canopies." Plant, Cell & Environment **18**(7): 788-794.

Young, J. C., I. Moarefi and F. U. Hartl (2001). "Hsp90: a specialized but essential protein-folding tool." The Journal of Cell Biology **154**(2): 267-274.

Yu, X., J. Klejnot, X. Zhao, D. Shalitin, M. Maymon, H. Yang, J. Lee, X. Liu, J. Lopez and C. Lin (2007). "Arabidopsis Cryptochrome 2 Completes Its Posttranslational Life Cycle in the Nucleus." The Plant Cell **19**(10): 3146-3156.

Zhao, J., D. S. Favero, H. Peng and M. M. Neff (2013). "Arabidopsis thaliana AHL family modulates hypocotyl growth redundantly by interacting with each other via the PPC/DUF296 domain." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **110**(48): E4688-E4697.

Zilian, E. and E. Maiss (2011). "An optimized mRFP-based bimolecular fluorescence complementation system for the detection of protein-protein interactions in planta." J Virol Methods **174**(1-2): 158-165.

Zilian, E. and E. Maiss (2011). "An optimized mRFP-based bimolecular fluorescence complementation system for the detection of protein-protein interactions in planta." Journal of Virological Methods **174**(1-2): 158-165.

## 7. Abkürzungen

3AT	3-Aminotriazol
<i>A.th.</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
Bp	Basenpaar
°C	Grad Celsius
Col	<i>A.th.</i> var. Columbia
cDNA	DNA Kopie der RNA
Da	Dalton
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
ECL	enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FR	Dunkelrotlicht
FR <sub>c</sub>	kontinuierliches Dunkelrotlicht
FR <sub>p</sub>	Dunkelrotlichtpulse
g	Gramm
<i>g</i>	Gravity force
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
h	Stunde

HIR	Hoch-Intensitäts-Reaktion
l	Liter
LB	lysogeny broth
LFR	„low fluence response“; Niedrig Fluenz Antwort
M	Mol pro Liter
m	Milli
mol	Mol
MS	Massenspektrometrie
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
phy	Phytochrom
PMSF	Phenylmethysulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RL	Rotlicht
RT	Raumtemperatur
SC	Synthetic complete
SDS	Natriumdodecylsulfat
T-DNA	Transfer DNA
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan

ÜN	Über Nacht
UpM	Umdrehungen pro Minute
VLF	„very low fluence“; Niedrigst Fluenz
VLFR	„very low fluence response“; Niedrigst Fluenz Antwort
v/v	Volumen pro Volumen
WL	Weißlicht
w/v	Gewicht pro Volumen
WT	Wildtyp
YPAD	Yeast Extract-Peptide-Dextrose plus Adenine medium
μ	Mikro

## **8. Eidesstattliche Erklärung**

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass die vorliegende Dissertation von mir selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt ist.

München, Juli 2016

Nicola Flosdorff

## **9. Erklärung über bisherige Promotionsversuche**

Diese Dissertation wurde keiner weiteren Prüfungskommission weder in Teilen noch als Ganzes vorgelegt. Ich habe nicht versucht, anderweitig eine Dissertation einzureichen oder mich einer Doktorprüfung zu unterziehen.

München, Juli 2016

Nicola Flosdorff